Anwendung des Erythrozyten-Antikörper-Rosettentests beim erblich dysgammaglobulinämischen und normogammaglobulinämischen Huhn

Carlo Piacenza

1979

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. U. Lösch

Anwendung des Erythrozyten-Antikörper-Rosettentests beim erblich dysgammaglobulinämischen und normogammaglobulinämischen Huhn.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Carlo Piacenza
aus
Friedrichshafen am Bodensee
München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. U. Lösch
Korreferent: Prof. Dr. H. G. Buschmann

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung und Literatur	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Literaturgliederung	4
1.2.1	Aktiver oder Immun-Rosettentest,	4
1.2.1.1	beim Huhn	4
1.2.1.2	beim Säuger	6
1.2.2	Spontaner oder Erythrozyten-Rosettentest,	7
1.2.2.1	beim Huhn	7
1.2.2.2	bei Mensch und Säuger	9
1.2.3	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest,	10
1.2.3.1	beim Huhn	10
1.2.3.2	bei Mensch und Säuger	13
1.2.3.3	Erythrozyten-Antikörper-Complement-Rosettentest	14
1.2.4	Natur und Nachweis des Fc-Rezeptors	15
1.3	Chronologische Auflistung der Literatur	17
1.4	Fragestellungen	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Tiermaterial	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Anti-Schaferythrozyten-Serum	23
2.2.1.1	Gewinnung	23
2.2.1.2	Bestimmung des Subagglutinationstiters	24
2.2.2	Vorbereitung der Zellen	25
2.2.2.1	Blutlymphozyten	25
2.2.2.1.1	Langsamzentrifugation	25
2.2.2.1.2	Separierung über Ficoll-paque	25
2.2.2.2	Milz-, Bursa- und Thymuszellen	26
2.2.3	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest	27
2.2.3.1	Methode A nach Ewald u.a. (26)	27
2.2.3.2	Methode B nach Ewald und Sanders (28)	28
2.2.4	Aktiver Rosettentest	28
2.2.5	Auszählung	28
2.2.6	Immunelektrophorese und einfache radiale Immundiffusion	29

		Seite
2.2.7	IgG-, IgM-Präparation	31
2.2.8	Anti-T-, Anti-B-Seren	31
2.2.9	Statistische Methoden	31
2.3	Voruntersuchungen	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest nach Methode A (2.2.3.1)	33
3.1.1	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest an Zellen des peripheren Blutes	33
3.2	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest nach Methode B (2.2.3.2)	36
3.2.1	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest an Zellen des peripheren Blutes	36
3.2.2	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest bei keimfrei gehaltenen Küken	36
3.2.3	Präinkubation von Immunglobulin-G und M	40
3.2.4	Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest nach Vorbehandlung mit Anti-B- und Anti-T-Seren	40
3.3	Aktiver Rosettentest	43
4	Diskussion	45
4.1	Besprechung der Methoden	45
4.2	Besprechung der Ergebnisse	49
5	Zusammenfassung	57
6	Summary	58
7	Literaturverzeichnis	59

Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
B-, T-Zelle	Bursa- beziehungsweise Thymus-abhängige Zellpopulation
C	Complement
EA	Erythrozyten-Antikörper-Komplex; mit Antikörpern gekoppelte Erythrozyten
EAC	Erythrozyten-Antikörper-Complement-Komplex
F ab	Antigenbindendes Fragment des Immunglobulinmoleküls
Fc	Kristallisierbares (crystallizable) Fragment des Immunglobulinmoleküls
FCA	Freundsches komplettes Adjuvans
HSA	Humanes Serum Albumin
IgG, IgM	Immunglobulin der Klasse G, beziehungsweise M
KG	Körpergewicht (Angabe in kg).
n	Anzahl
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
s	Standardabweichung
UpM	Umdrehung pro Minute
$\bar{x}$	Statistischer Mittelwert

1 Einleitung und Literatur

1.1 Einleitung

Brüggemann u.a. (17) fanden bei der immunelektrophoretischen Untersuchung des Serumeiweißbildes eines HNL-Leghorn-Hahnes eine starke Verminderung der Immunglobulin-G-, bei gleichzeitiger, deutlicher Verstärkung der Immunglobulin-M-Präzipitationslinie. Mit diesem Hahn und weiteren Tieren wurde eine Zuchtlinie erstellt, in der dieses Immunglobulinmuster gehäuft auftritt (57; siehe 2.1). Bei den Nachkommen dieser Tiere wurden im Laufe der letzten Jahre verschiedene Charakteristika untersucht: die Serumimmunglobulinkonzentration (18), das Antikörperbildungsvermögen (19, 58), die physikochemischen Eigenschaften des IgG (39, 66), der Immunglobulinverlauf (47), die Zelloberflächenimmunglobuline (40, 41) und die Kinetik zellvermittelter Immunreaktionen (32, 77). Die bei diesen Untersuchungen ermittelten Ergebnisse deuten auf die B-Zellabhängigkeit des IgG-Defektes hin. Im Rahmen dieser Arbeit soll mit Hilfe des Erythrozyten-Antikörper (EA)-Rosettentests untersucht werden, ob erblich dysgammaglobulinämische Hühner einen Mangel an EA-Rosetten bildenden Zellen aufweisen. Auf die Beziehung zwischen EA-Rosetten bildenden Zellen, B-Zellen und Fc-Rezeptor-tragenden Zellen wird im anschließenden Literaturteil eingegangen.

Das Prinzip des Rosettentests besteht darin, daß sich xenogene Erythrozyten ring- oder kugelförmig um immunkomponente Zellen lagern (Vgl. Schema 1, Seite 16

und Foto 1, Seite 22). Ivanyi u.a. (44) sprechen von einem morulaähnlichen Aussehen, Sato (74, 75) vergleicht die von Wachtelerythrozyten gebildeten Rosetten mit Chrysanthemen oder Kamelien. Jondal, Holm und Wigzell (45) beschreiben die Rosettenbildung folgendermaßen: Die Zellen, die vermutlich Rezeptoren tragen, werden mit Signalzellen, die eine - dem Rezeptor entsprechende - Substanz an ihrer Oberfläche tragen, inkubiert. Diese Substanz kommt entweder natürlich vor oder wird angekoppelt. Bei der Inkubation werden die Signalzellen, meist Erythrozyten, von den rezeptortragenden Zellen an ihrer Oberfläche gebunden. Im allgemeinen wird eine Zelle, die drei und mehr Erythrozyten an ihrer Oberfläche bindet, als Rosette bezeichnet. Nach der mikroskopischen Untersuchung wird die Anzahl rosettenbildender Zellen zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt und meist als rosettenbildende Zellen pro 100 oder 1000 ausgezählte Zellen angegeben.

Die mikroskopische Untersuchung kann mittels spezifischer Färbemittel verbessert werden. Tufveson u.a. (79) fixieren die Rosetten mit Glutaraldehyd und Methanol und färben anschließend mit Methylengrün und Pyronin. Ewald u.a. (26) verwenden eine Zytozentrifuge mit nachfolgender Methanolfixierung und May-Gründwald-Giemsa-Färbung.

Die Rosettentechnik gehört zu den direkten Nachweismethoden immunkompetenter Zellen, ebenso wie radioaktive oder fluorochromatische Nachweise.

In einer 1974 erschienenen Arbeit versucht Mercier (62) erstmals eine Systematisierung der verschiedenen Rosettentests, den Zaalberg (84) und Nota u.a. (65) unabhängig voneinander eingeführt haben, vorzunehmen, um Vergleichbarkeit zu erreichen und Verwirrung zu vermeiden.
Von der technischen Seite her empfiehlt er folgende Differenzierungsmöglichkeiten:

a) für die Reaktion: sofort, verzögert (Zellpräinkubation).

b) für den Test: schnell (Zentrifugation)
langsam (Sedimentation).

c) für die Ablesung: sofort oder nach vorgegebener Zeit.

Der Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest, der dieser Arbeit zugrunde liegt, wird von Mercier expressis verbis nicht erwähnt; ebenso macht er nur wenige Aussagen über die Bedeutung des, gerade beim Huhn viel untersuchten, B-T-Zellsystems für die einzelnen Arten von Rosettentests.
Aufgrund der Annahme, daß der IgG-Defekt erblich dysgammaglobulinämischer Hühner B-Zell-abhängig ist und der Frage, inwieweit ein Zusammenhang mit dem Fc-Rezeptor besteht, ist, unter Berücksichtigung neuerer Literatur, folgende Systematik erstellt worden, die speziell auf das Huhn ausgerichtet ist und sich auf die Fragestellung der vorgelegten Arbeit bezieht.

1.2 Literaturgliederung, aufgestellt unter Berücksichtigung der B-T-Zell und Fc-Rezeptor Charakteristika

1.2.1 Der aktive oder Immun-Rosettentest (11, 12, 22, 25, 29, 38, 44, 45, 46, 60, 65, 79, 80, 84, 85).

Dieser Test wird nach ein- oder mehrmaliger Immunisierung mit Erythrozyten durchgeführt. Wie Biozzi u.a. (11) nachweisen, sind verschiedene Zellarten (Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Blastzellen) an der Rosettenbildung beteiligt. Diese Methode wird von Jondal u.a. (45), Hemmingson und Alm (38) und Felsburg und Edelman (29) als aktiver oder Immun-Rosettentest bezeichnet.

1.2.1.1 Der aktive Rosettentest beim Huhn

Dent und Good (22) wenden einen aktiven Rosettentest an, um den Einfluß der Bursa Fabricii auf das immunglobulinproduzierende System zu untersuchen. Dabei finden sie, daß Bursa und Thymus im Gegensatz zur Milz fast keine Zellen enthalten, die Hämagglutinine gegen Schaferythrozyten enthalten. Bei Kiszkiss u.a. (46) findet sich über der Schwellendosis (5×10^7 Erythrozyten) eine direkte Korrelation zwischen der Menge immunisierender Erythrozyten und der Anzahl aktiver Rosetten. Die höchsten Rosettenzahlen treten fünf Tage nach Immunisierung auf und fallen bis zum 12. Tag wieder ab. Sie sehen in der Antigen (Erythrozyten) -Bindung ein frühes Stadium der Immunantwort und postulieren einen Synergismus zwischen

T- und B-Zellen bei der humoralen Antwort auf xenogene Erythrozyten. Nach Bursektomie und Bestrahlung finden sich keine aktiv rosettenbildenden Zellen mehr. Folglich dürfen alle aktiv rosettenbildenden Zellen des Huhnes B-Zellen sein. Es scheint sowohl die Antigen-Bindung, als auch die Antikörper-Sekretion zu versagen.
Die Ergebnisse von Hemmingson und Alm (38) bestätigen jene von Kiszkiss u.a. (45). Die aktiv rosettenbildenden Zellen scheinen im bursalen Gewebe differenziert zu werden und dann in periphere lymphatische Organe zu wandern. Obwohl die aktiv rosettenbildenden Zellen nach Meinung dieser Autoren in ihrer Entwicklung vollständig von der Bursa Fabricii abhängig sind, scheinen sie vielleicht durch die Einwirkung eines Thymushormons T-Zell-spezifische Charakteristika zu erwerben. Die Bursektomie verringert die Anzahl rosettenbildender Zellen insgesamt stärker als die IgM-Synthese und beeinflußt den IgM-abhängigen Plaquetest weniger (38).
Webb und Cooper (80) untersuchen Thymuszellen und periphere Blutlymphozyten bursektomierter, agammaglobulinämischer Hühner auf Rosettenbildung mit Schaferythrozyten vor und nach der Inkubation mit primärem Immunserum normaler Tiere. Unimmunisierte und agammaglobulinämische Tiere haben weniger als 0,1 % Rosetten, was durch Inkubation mit normalem Hühnerserum nicht beeinflußt wird. Ivanyi u.a. (44) weisen durch Vorbehandlung der Zellen mit Kaninchen-Anti-T-Zell-Globulin nach, daß aktiv rosettenbildende Lymphozyten keine T-Zellen sind. Ein

Großteil der Lymphozyten wird zerstört, ohne daß die Zahl aktiv rosettenbildender Zellen abnimmt. Dagegen wird die aktive Rosettenbildung durch Säuger-Anti-Huhn-IgG vollständig gehemmt.

1.2.1.2 Der aktive Rosettentest bei anderen Tierarten

Bereits 1950 beobachten Reiss u.a. (71) die Bakterienanlagerung an Zellen von Tieren, die gegen diese Bakterien immun sind.
Zaalberg (84) und Nota u.a. (65) weisen unabhängig voneinander auf das Phänomen der aktiven Rosettenbildung hin und führen die einfache Methodik und die höhere Sensitivität im Vergleich zum Plaque-Test auf. Die von ihnen eingeführten Begriffe 'cluster' und 'immuno-cyto-adhérence - werden heute durch den Begriff Rosetten ersetzt. Zudem stellen sie fest, daß im Thymus (84) und nach passiver Immunisierung (56) keine rosettenbildenden Zellen auftreten. Weitere Untersuchungen (85) zeigen, daß die Absorption von zytophilen Antikörpern zur Rosettenbidlung führt.
Mehrere Autoren (11, 52, 60, 65) finden nach gleichzeitiger Immunisierung mit zwei Erythrozytenarten einen relativ geringen Anteil (1,5 - 20 %) 'mixed rosettes' an der Gesamtzahl rosettenbildender Zellen und folgern, daß von den aktiv rosettenbildenden Zellen ein monospezifischer Antikörper produziert wird.
In neueren Untersuchungen (25) an Mäusezellkulturen

scheinen Subpopulationen antigenbindender Zellen Effektoren der zellvermittelten Zytotoxizität zu sein und bei der Allergie vom verzögerten Typ eine Rolle zu spielen.

1.2.2 Der spontane oder Erythrozyten-Rosettentest

Die spontanen Rosetten sind definiert als Rosetten, die unabhängig von einer vorangegangenen Immunisierung auftreten (3, 4, 7, 15, 16, 35, 43, 45, 52, 54, 61, 69, 70, 72, 74, 75, 80, 81, 82).
Dabei handelt es sich um thymusabhängige Zellen, die durch spezifische Oberflächendeterminanten mit xenogenen Erythrozyten - also nicht mit Erythrozyten-Antikörper-Komplexen - Rosetten bilden. Diese Rosettenbildung beruht nicht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion (3, 70).

1.2.2.1 Der spontane Rosettentest beim Huhn

Bäck und Alm (4) untersuchten Milz und Bursa auf spontane Rosettenbildung mit Schaferythrozyten. Milz- ($5/10^6$) und Bursazellen ($90/10^6$) zeigen spontane Rosettenbildung, die zu über 90 % mit Antiimmunglobulinseren gehindert wird. Richter u.a. (72) finden zwischen 0,2 und 0,4 % spontan rosettenbildender Zellen nach Inkubation mit Erythrozyten vom Schaf und Kaninchen. Eine Beziehung zum B-T-Zellsystem stellen sie nicht her.
Sie nehmen an, daß die rosettenbildenden Zellen und die heteroagglutinin-sezernierenden Zellen nicht identisch sind.

Isaković u.a. (43) berichten über spontane Rosettenbildung von Lymphozyten thym- und bursektomierter Hühner mit Erythrozyten vom Meerschwein. Sie zeigen, daß B- und T-Zellen zur Rosettenbildung fähig sind und daß durch Präinkubation mit Anti-Ig-Serum eine Rosettenhemmung eintritt.

Sato (74) und Sato und Itoh (75) untersuchen die spontane Rosettenbildung von Hühnerlymphozyten und erzielen dabei mit Wachtelerythrozyten die höchsten Ergebnisse. Die spontan rosettenbildenden Zellen des Thymus und des peripheren Blutes sind mechanisch instabil; durch verschiedene Verfahren können 'lockere' und 'feste' Rosetten unterschieden werden. Es handelt sich um einen energieabhängigen Prozeß.

Beide Rosettenarten sind gegen Hemmsubstanzen, deren effektivste Anti-L-Ketten-Serum ist, gleich empfindlich. Die Erythrozytenrezeptorenstelle scheint aus Proteinen, möglicherweise aus Ig-ähnlichen, zu bestehen.

Anti-Thymus-Serum hindert, sogar ohne Complementanwesenheit, die Rosettenbildung in vitro. Die 'festen' Rosetten scheinen von T-Zellen gebildet zu werden, wie durch Thymektomie und Anti-Thymus-Serum nachgewiesen werden konnte; durch Anti-B-Serum tritt keine Blockierung ein. Die 'lockeren' Rosetten werden durch Thymektomie und Bestrahlung nur gering behindert; sie besitzen vermutlich weniger T-spezifische Antigene.

Es wird vermutet, daß der Thymus die Entstehung der 'feste' Rosetten bildenden Zellen durch einen humoralen

Faktor beeinflußt. Merkwürdig erscheint nur; daß der Thymus selbst wenig 'feste' Rosetten aufweist; eventuell liegt der humorale Faktor in einer inaktiven Form vor oder benötigt ein bestimmtes Mikroenviroment.

1.2.2.2 Der spontane Rosettentest bei anderen Tierarten und beim Menschen

Spontane Rosetten werden nach Auffassung von Laskov (30) eher von antikörperproduzierenden Zellen gebildet als von Zellen, an die zytophile Antikörper gekoppelt sind. Die spontane Rosettenbildung weist keine Korrelation mit dem Serumtiter auf (11) und kann durch Anti-T-Serum irreversibel (3, 74, 75, 81) und durch Azathioprine (Purinsyntheseblocker) reversibel gehemmt werden. Eine Präkonditionierung gegen xenogene Erythrozyten wird postuliert (3).

Die Zellen, die spontane Rosetten bilden, tragen keine Ig-Determinanten und sind folglich T-Zellen (15, 16). Weil die Erythrozyten schwächer als bei anderen Rosettentests gebunden werden, sind optimale technische Voraussetzungen notwendig (45).

Die Existenz einer Nullpopulation (weder T-, noch B-Zellen) wird verneint (42, 45, 70), beziehungsweise bejaht (61), wobei ein Teil dieser Nullpopulation noch Fc-Rezeptoren tragen soll (67; vgl. 1.2.5).

Eine große morphologische Ähnlichkeit zwischen T-Zellen und den Zellen, die spontane Rosetten bilden, wird elektronenmikroskopisch festgestellt (54).

Innerhalb der T-Zellpopulation werden qualitative (spontane Rosettenbildung bei 37° C) und qualitative (Theta-Antigen-Konzentration, Rezeptorendichte) Unterschiede gefunden (7, 61, 69).
Die Quantität der spontanen Rosetten kann durch die Vorbehandlung der lymphatischen Zellen (37) oder der Erythrozyten (35, 61, 70) mit Neuraminidase gesteigert werden.

1.2.3 Der Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest (1, 5, 6, 8, 15, 16, 20, 21, 26, 26, 28, 30, 33, 48, 49, 50, 51, 55, 67, 68, 70, 78, 83)

Vor der Inkubation mit lymphatischen Zellen werden die Erythrozyten mit Anti-Erythrozyten-Serum oder Anti-Erythrozyten-IgG gekoppelt. Dadurch unterscheidet sich dieser Test wesentlich von dem aktiven (vorangehender Immunisierung) und dem spontanen (keine Kopplung der Erythrozyten) Rosettentest (vgl. 1.2.1 und 1.2.2). Dieser Test dient dem Nachweis von IgG-Rezeptor-tragenden Zellen. Da dabei das Fc-Stück des IgG-Moleküls gebunden wird, wird der IgG-Rezeptor allgemein als Fc-Rezeptor bezeichnet (vgl. 1.2.4).

1.2.3.1 Der Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest beim Huhn

Die Kopplung eines gegen Schaferythrozyten gerichteten Hühnerserums auf Schaferythrozyten - das Serum liegt in der 'gerade subagglutinierenden' Konzentration vor - be-

nützen Ewald, Freedman und Sanders (26) zur Charakterisierung von Zellen lymphatischer Organe des Huhnes. Mittels des EA-Rosettentests zeigen sie, daß der bei Mensch, Maus, Ratte und Meerschwein gefundene Fc-Rezeptor auch beim Huhn vorhanden ist und ein Analogon darstellt. Sie betimmen Lymphozytensubpopulationen, Monozyten und Heterophile als die Zellarten, die einen Fc-Rezeptor tragen. Sie beschreiben die Verteilung der rosettenbildenden Zellen in unterschiedlichen Organen und bei verschiedenen Altersstufen. Sie finden große individuelle Schwankungen bei gleichaltrigen Tieren und gleichen Zellarten. Sehr früh (embryonal) werden sehr hohe Rosettenzahlen (über 30 %) in der Bursa gefunden. Sie schließen daraus, daß die rosettenbildenden Zellen in der Bursa heranreifen und folglich B-Zellen sind.

Auch de Kruyff u.a. (51) zeigen, daß, zumindest in der Milz, die Anzahl EA-rosettenbildender Zellen eng mit der Anzahl Oberflächen-Ig-tragender Zellen korreliert und es sich also um B-Zellen handelt. Die Ausbildung des Fc-Rezeptors scheint aber hinter der der Oberflächen-Immunglobuline zurückzubleiben. Milzzellen bursektomierter Hühner zeigen einen wesentlich geringeren Prozentsatz rosettenbildender Zellen, der, im Gegensatz zu normalen Tieren, auch mit dem Alter nicht ansteigt. Sie vermuten, daß es sich hierbei um Fc-Rezeptoren-tragende Monozyten handelt.

Ewald, Freedman und Sanders (27) finden EA-Rezeptoren vornehmlich auf Lymphozyten bursalen Ursprungs und nicht

auf Erythrozyten und Plasmazellen. Ausschließlich die Koppelung mit IgG vom Huhn befähigt die Schaferythrozyten zur Rosettenbildung. Eine Beladung der Erythrozyten mit dem Fab-Stück führt zu keiner Rosettenbildung. Die Rosettenbildung wird von Säuger-IgG nicht, von Schildkröten- und Gänse-IgG teilweise, von Truthahn- und Hühner-IgG und Fc-Fragment vollständig gehemmt.
Vorbehandlung der Milzzellen mit spezifischen Antiseren (Anti-Bursa , Anti-Thymus, Anti-Leichte-Ketten) beeinträchtigt die Rosettenbildung nicht; der Fc-Rezeptor ist also kein gewebespezifisches Antigen oder Immunglobulin.
Bei Untersuchungen über die EA-Rosettenbildung bei normalen und bursektomierten Hühnern finden Ewald und Sanders (28), daß der Prozentsatz rosettenbildender Zellen in keinem Zusammenhang mit dem Grad der Agammaglobulinämie steht und sich bei bursektomierten und normalen Tieren nicht unterscheidet.
Chiao, Lifter, Good und Choi (21) gingen in ihren Untersuchungen davon aus, daß bursektomierte Hühner keine B-Zellen besitzen, nicht fähig sind humorale Immunantworten auf wiederholte Immunisierungen zu entwickeln, keine aktiven Rosetten bilden können und keine Oberflächenimmunglobuline besitzen. Lymphozyten dieser Tiere sind thymusabhängig und zeigen verstärkte, zellvermittelte Immunität. Sie zeigen nun, daß bei bursektomierten Hühnern zwei Lymphozytensubpopulationen existieren: T^+-Lymphozyten, die Membranrezeptoren für das Hühner-IgG-Fc-Fragment besitzen und T^--Lymphozyten,

die keine IgG-Fc-Rezeptoren tragen. Die T^+-Lymphozyten sind für das Fc-Fragment des Hühner-IgG spezifisch. Es handelt sich dabei nicht um Makrophagen und Monozyten. Die Rosettenbildung kann bei agammaglobulinämischen Tieren durch antigene Stimulierung gesteigert werden. Nach Zelltransfer kooperieren die T^--Zellen mit B-Zellen, während die T^+-Zellen keine Helferfunktion zeigen.

1.2.3.2 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest bei Mensch und Säuger

Reine B-Zellabhängigkeit des EA-Rosettentests vermuten Krammer und Pernis (48, 49) bei der Maus und Reeves und Renshaw (70) beim Rind. Diese, Froland und Natvig (33), sowie Ferrarini u.a. (30) finden auch Lymphozyten, die sowohl Fc-Rezeptoren tragen, als auch spontane Rosetten bilden.

Dickler (24) behauptet, daß es entweder mehr als einen, wenn auch sehr ähnlichen Rezeptor gibt, oder aber unterschiedliche Lymphozythenpopulationen den gleichen Rezeptor tragen. Eine Reihe von Autoren (15, 50, 83) findet den Fc-Rezeptor außer auf B-Zellen auch noch auf aktivierten T-Zellen (durch Passage von Thymuszellen in allogenen, bestrahlten Mäusen gewonnene Zellen), wobei der B-Zellrezeptor durch IgG und IgG-Ag-Komplex gehemmt wird, der T-Zellrezeptor nur durch IgG-Ag-Komplex. Anzeichen von Killerzellfunktionen auf Fc-Rezeptor-tragenden Lymphozyten werden ebenfalls beobachtet. So von Krammer u.a. (50) und van Oers u.a. (67), letztere fin-

den keinen Überhang von Fc-Rezeptor-tragenden Zellen und Oberflächen-Ig-tragenden Zellen.
Killerzellfunktionen finden Chiao und Good (20) bei zwei Lymphozytensubpopulationen, die sich darin unterscheiden, daß eine zusätzlich Complementrezeptoren zum IgG-Rezeptor und zur spontanen Rosettenbildungsfähigkeit besitzt.

1.2.3.3 Der Erythrozyten-Antikörper-Complement-Rosettentest

Hierbei werden zusätzlich zu dem Anti-Erythrozytenserum noch Complementkomponenten auf die Erythrozyten gekoppelt (9, 10, 20, 27, 37, 45, 53, 61).
Lay und Nussenzweig (53) finden mit dieser Methode, daß Thymozyten der Maus nicht fähig sind EAC-Komplexe zu binden und sehen in dieser Membraneigenschaft eine Möglichkeit Lymphozytensubpopulationen zu charakterisieren. Die EAC-Rezeptoren finden sich auf Makrophagen, polymorphkernigen Zellen und Lymphozyten. Die Fixierung von Complementkomponenten scheint für die Bindung von Antigen-Antikörperkomplexen auf immunkompetente Zellen wichtig zu sein und stellt in dem mehrschichtigen Prozeß der Phagozytose den ersten Schritt dar. Die Ankoppelung der Erythrozyten induziert eine Steigerung der Membranaktivität der bindenen Zelle und deformiert die Erythrozyten. Der Prozentsatz Ig-tragender Zellen korrespondiert eng mit dem EAC-Rezeptoren tragender Zellen (10, 45).
Eine nur geringgradige Rosettenbildung mit EA(IgG)-Com-

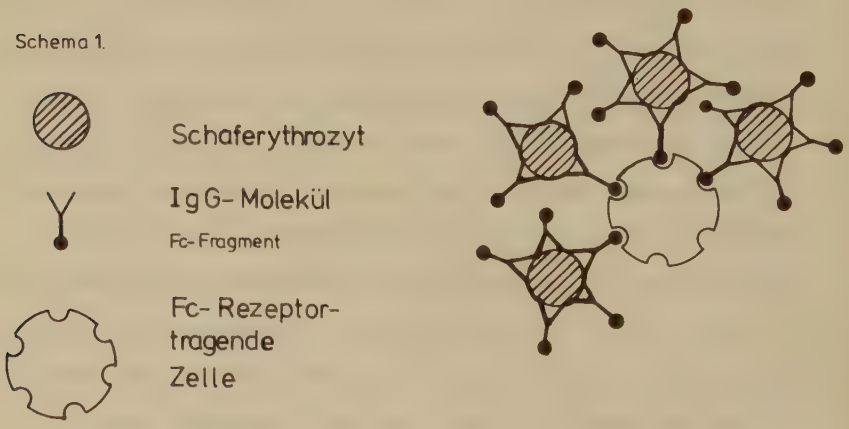
plement und keine Rosettenbildung mit EA (IgM)-Complement finden Ewald u.a. (27) beim Haushuhn.

1.2.4 Natur und Nachweis des Fc-Rezeptors (siehe 1.2.3)

Den ersten Nachweis des Fc-Rezeptors erbrachten Basten u.a. (5, 6) mit ^{125}Jod markierten Antigen. Sie schließen aus der engen Korrelation mit Oberflächen-Ig-tragenden Zellen, aus der negativen Korrelation mit theta-positiven Zellen, aus dem Rückgang der Antikörperbindung nach Bursektomie und der Unbeeinflußbarkeit durch Thymektomie, daß es sich bei den Fc-Rezeptor-tragenden Zellen um B-Zellen handeln müsse. Dies bestätigen Paraskevas (68), Dickler und Kunkel (23) und Andersson und Grey (2), obwohl letztere auf Nicht-B-Zellen auch Rezeptoren für IgG-Moleküle finden. Diese unterschiedlichen Auffassungen veranlassen Halloran und Schirrmacher (36, 78) im Fc-Rezeptor ein 'Konzept' zu sehen, das solche Zellmembrankomponenten beschreibt, die sich mit den Fc-Fragmenten von IgG-Molekülen binden. Ob eine bestimmte Komponente ein Fc-Rezeptor ist oder nicht, und ob bestimmte Zelltypen Fc-Rezeptoren tragen oder nicht, hängt von der Sensitivität des Tests ab. Der Fc-Rezeptor beschreibt ein 'bindendes Ereignis', das mit unterschiedlicher Avidität bei verschiedenen Zelltypen eintreten kann. Die chemische Struktur der Rezeptoren ist bisher unbekannt. Die Frage, ob T-Zellen einen Fc-Rezeptor tragen, ist besser gestellt, wenn gefragt wird, wie groß ist die relative Stärke mit der T-Zellen Ig

binden, bzw., wie groß ist die Anzahl von Bindungsstellen bestimmter Zellen? Konventionelle Tests können das nicht unterscheiden. Der physiologische Status der Zellmembran trägt zu Affinität des Ig-Fc-Rezeptors bei. Die Aktivierung der Zelle ändert die Affinität, so können Antikörper gegen die Zellmembran eine örtliche Membranstörung verursachen, wodurch die Fc-Fragment-bindenden Stellen beeinflußt werden. Auf diese Weise kann die Hemmung des Fc-Rezeptors erklärt werden.
In der folgenden Literaturzusammenstellung soll die chronologische Entwicklung gezeigt und ein schneller Einblick ermöglicht werden.

Schema 1.



Prinzip des Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest.
Nach Sensibilisierung der Erythrozyten werden die Fc-Fragmente der IgG-Moleküle, die den Erythrozyten angelagert sind, von den Fc-Rezeptoren der Zelle gebunden.

1.3 Kurze, chronologische Auflistung der Rosettentests

Diese Aneinanderreihung soll einen schnellen Überblick über die einzelnen Tests und ihre Fragestellungen ermöglichen.

1950 -Bakterienanlagerung an immune Zellen. (71)

1964 -Bestimmung antikörperbildender Zellen durch den aktiven Rosettentest. (65, 84)

1965 -Rolle der Bursa Fabricii bei der Antikörperproduktion, aktiver Rosettentest. (22) Huhn

1966 -Vergleich aktiver Rosetten- zu Plaquetest. (85)

-Vorkommen von 'mixed rosettes' nach Doppelimmunisation beim aktiven Rosettentest. (11)

1967 -EA-Rosettentest. (68)

1968 -Eigenschaften von Complementrezeptoren, EAC- und EA-Rosettentest. (53)

-Spontaner Rosettentest. (52)

1970 -EAC-Rosettentest. (9)

-Spontaner Rosettentest, T-Zellabhängigkeit. (3)

1971 -EAC-Rosettentest. (10)

1972 -Aktiver Rosettentest, B-Zellabhängigkeit. (46)

-EA-Rosettentest, Fc-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen. (83)

-Spontaner und EAC-Rosettentest, B- und T-Zellabhängigkeit. (45) Huhn

1972	-Vergleich aktiver Rosettentest zu Plaquetest, Beeinflussung durch Bursektomie.	(38)	Huhn
	-Spontaner Rosettentest.	(82)	
1973	-Spontaner und EA-Rosettentest, Vergleich B- und T-Zellen.	(16)	
	-Spontaner Rosettentest.	(4)	Huhn
	-Spontaner und EAC-Rosettentest, Vergleich B- und T-Zellen	(61)	
	-Spontaner Rosettentest, Neuraminidasebehandlung.	(7)	
	-Spontaner und aktiver Rosettentest, Beeinflussung durch Bursektomie.	(80)	Huhn
	-Vorkommen von 'mixed rosettes' nach Doppelimmunisation beim aktiven Rosettentest.	(79)	Huhn
	-Spontaner und EAC-Rosettentest, Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen.	(15)	
1974	-Gliederung der Rosettentests.	(62)	
	-Spontaner und EA-Rosettentest.	(30)	
	-Spontaner Rosettentest.	(72)	Huhn
	-Spontaner Rosettentest bei thymektomierten und bursektomierten Hühnern.	(43)	Huhn
	-EA-Rosettentest.	(78)	
1975	-Spontaner Rosettentest, Morphologie.	(54)	
	-Spontaner Rosettentest, technische Aspekte.	(81)	
	-Bispezifische Rosetten nach Doppelimmunisierung beim aktiven Rosettentest.	(60)	

1975 -Aktivierte T-Zellen beim aktiven Rosettentest. (12)

1976 -EA-Rosettentest, Interaktion und Hemmung des Fc-Rezeptors mit IgG. (48, 49)

-EA-Rosettentest, Nachweis des Fc-Rezeptors auf T-Zellsubpopulationen (50)

-EA-Rosettentest, Vorkommen, Spezifität, alters- und organmäßige Verteilung des Fc-Rezeptors. (26, 27) Huhn

-Spontaner und EAC-Rosettentest, Neuraminidaseeinfluß. (35, 37)

-Verschiedene Rosettentest zur Charakterisierung von B- und T-Zellen. (20)

-Spontaner Rosettentest. (69)

-Aktiver Rosettentest, Hemmung und Recovery. (44) Huhn

1977 -Spontaner Rosettentest, T-Zellabhängigkeit. (74, 75) Huhn

-EA-Rosettentest. (67)

-EA-Rosettentest bei bursektomierten Tieren. (51) Huhn

-Aktiver Rosettentest und Allergie vom verzögerten Typ. (29)

-EA-Rosettentest bei bursektomierten Tieren. (28) Huhn

1978 -EA-Rosettentest, biomathematische Charakteristika des Fc-Rezeptors. (8)

1978	-EA-Rosettentest bei bursektomierten Tieren.	(21)	Huhn
	-EA-Rosettentest.	(1)	
	-Spontaner und EA-Rosettentest.	(70)	
1979	-Aktiver Rosettentest bei Zellkulturzellen.	(25)	

1.4 Fragestellungen

Folgende Fragestellungen werden im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

1) Inwieweit unterscheiden sich erblich dysgammaglobulinämische und normogammaglobulinämische Hühner der Linie B 12 und nicht B-typisierte Kontroll-Hühner bezüglich der Erythrozyten-Antikörper-Rosettenbildung?
2) Wird die EA-Rosettenbildung durch einen IgG-spezifischen Rezeptor verursacht?
3) Handelt es sich bei den EA-Rosetten bildenden Zellen um Bursa- oder Thymus-abhängige Zellen und inwieweit unterscheiden sich erblich dysgammaglobulinämische und Kontrollhühner hierin?
4) Welchen Einfluß hat die Keimfreihaltung auf die EA-Rosettenbildung?

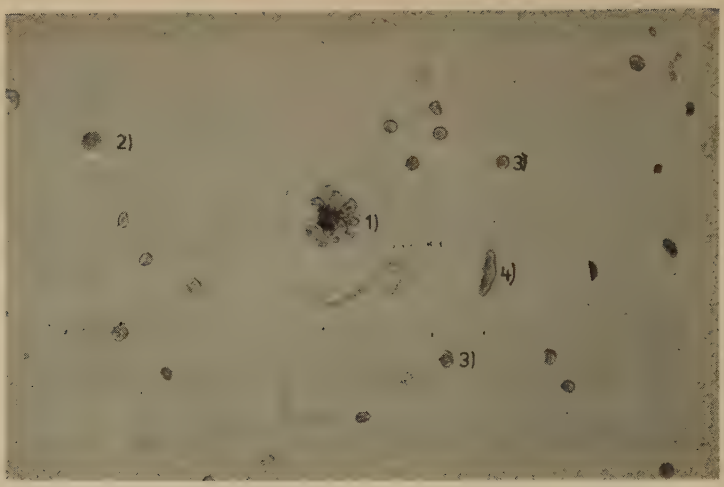


Foto 1) EA-Rosette mit mindestens 7 angelagerten Erythrozyten.

1) rosettenbildende Zelle
2) angefärbter Lymphozyt
3) Schaferythrozyten
4) seitlich liegender Hühnererythrozyt

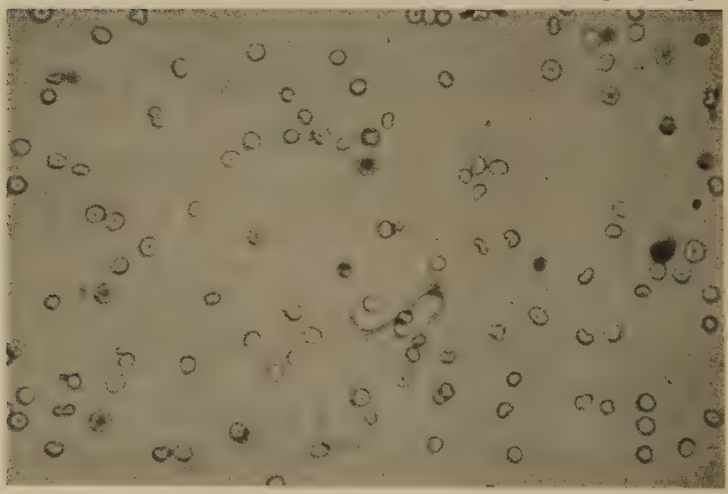


Foto 2) Negativ-Kontrolle ohne Rosettenbildung, die Anlagerung von Erythrozyten ist zufällig.

2. Material und Methoden

2.1 Tiermaterial

Als Zellspender dienen die eingangs erwähnten erblich dysgammaglobulinämischen Hühner, die im Institut erbrütet und aufgezogen werden. Dabei handelt es sich um:

a) permanent dysgammaglobulinämische Hühner der Linie B 12 (31),

b) normogammaglobulinämische Hühner der Linie B 12 (31),

c) immunologisch intakte, nicht B-typisierte Kontrollhühner, sowie LSL-Leghorn Hühner[+].

Es werden sowohl Tiere am 16. Embryonaltag, als auch bis zu 5 Monate, während der Vorversuche, über ein Jahr alte Hühner untersucht. Die Hühner werden konventionell gehalten, auf Gitterrosten aufgezogen und erhalten pelletiertes Legehennenalleinfutter[++] und Wasser ad libitum.
Zu Vergleichszwecken werden auch keimfrei gehaltene Küken (63) in die Untersuchung miteinbezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Anti-Schaferythrozyten-Serum

2.2.1.1 Gewinnung des Antiserums

Die Gewinnung wird, wie von Ewald u.a. (26) beschrieben,

[+] Lohman-Selected-Leghorn-Vermehrungsbetriebe 8051 Gut Heinrichsruh.

[++] Legehennenalleinfutter nach DLG-Standard, BayWa AG Moosach.

durchgeführt. Immunisiert werden 8 Wochen alte LSL-Leghorn-Hühner. Dazu werden Schaferythrozyten[+] 5x in 0,85%iger NaCl-Lösung gewaschen und eine 20 %ige Schaferythrozytensuspension in 0,75 %iger NaCl-Lösung hergestellt. In zweitägigen Intervallen wird den Hühnern 14 Tage lang intravenös von 0,1 ml beginnend bis maximal 0,5 ml 20 %-ige Schaferythrozytenlösung injiziert. Sieben Tage nach der letzten Injektion werden die Hühner zur Gewinnung des Antiserums entblutet. Das Serum wird bei 56° C 30 min lang inkubiert, um Complementfaktoren zu inaktivieren.

2.2.1.2 Bestimmung des Subagglutinationstiters

Vor Durchführung des Erythrozyten-Antikörper-Rosettentests wird die 'gerade subagglutinierende Verdünnung' bestimmt. Dieser Titer ist definiert als die niedrigste Antiserumverdünnung, die keine Agglutination der Erythrozytensuspension verursacht.

Nach 5maligem Waschen in 0,85 %iger NaCl-Lösung wird eine 5 %ige Schaferythrozytensuspension in Medium (RPMI 1640, Fa. Seromed München) hergestellt. Mit dieser Suspension und verschiedenen Serienverdünnungen des Huhn-Anti-Schaferythrozyten-Serums in Medium wird die 'gerade subagglutinierende Verdünnung' in Mikrotitrationsplatten (V-Form, Fa. Göddeke, 8072 Manching) und Reagenzgläschen (10 x 70 mm, Fa. Bellco, Schweiz) bestimmt.

[+] Schaferythrozyten, konserviert, Fa. Oxoid 423 Wesel.

2.2.2 Vorbereitung der Zellen

2.2.2.1 Blutlymphozyten

2.2.2.1.1 Langsamzentrifugation

Nach Entnahme von ca. 9 ml aus der vena cutanea ulnaris wird das Blut in einem Plastikröhrchen (PS-Röhrchen G 17/100, Fa. Boll, München) mit einer Heparinlösung (100 iE/ml, Heparin-Natrium, Fa. Serva, Heidelberg) durch vorsichtiges Schütteln vermengt. Nach 1 : 1 Verdünnung mit PBS (Phosphate Bufferd Saline, Dulbeco, ohne Ca^{++} und Mg^{++}; Fa. Seromed, München) wird bei 200 UpM 10 min lang zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wird mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und bei 1000 UpM 10 min lang zentrifugiert. Der Niederschlag wird 3 mal mit Medium gewaschen und bei 800 UpM 10 min lang zentrifugiert. Die Blutlymphozyten werden bei 240 facher Vergrößerung in einer Neubauerkammer ausgezählt und ihre Lebensfähigkeit mit Trypanblau (Trypanblau; Fa. Serva, Heidelberg) bestimmt. Die Lebensfähigkeit beträgt zwischen 90 und 95 %, die Zellzahl wird auf 1×10^7 pro ml eingestellt.

2.2.2.1.2 Separierung über einen Dichtegradienten (14)

Das Blut wird, wie unter 2.2.2.1.1 beschrieben, gewon-

nen. Nach 1 : 1 Verdünnung mit Trispuffer[+] wird die Zellsuspension mit Carbonyleisen (20 mg/ml Zellsuspension, Fluka Ag Buchs SG/Schweiz) 30 min bei 37° C im Schüttelbad inkubiert, um phagozytierende Zellen zu entfernen. Fünf ml der Zellsuspension werden vorsichtig auf 3 ml Ficoll-paque (Fa. Pharma Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) geschichtet und bei 1200 UpM 20° C 40 min lang zentrifugiert. Der Lymphozytensaum wird vorsichtig abgenommen und wie oben (2.2.2.1.1) weiterbehandelt.

2.2.2.2 Milz-, Bursa- und Thymuszellen

Nach Töten der Tiere durch Dekapitation werden die Organe entnommen und in Medium mittels Pinzette und Injektionskanüle 'gezupft'. Zur Entfernung gröberer Partikel wird die Zellsuspension 10 min stehen gelassen. Danach wird der Überstand abpipettiert und bei 800 UpM 10 min abzentrifugiert und 3 x mit Medium gewaschen. Auszählung und Bestimmung der Lebensfähigkeit geschieht in der Neubauerkammer. Die Lebensfähigkeit beträgt zwischen 90 und 95 %.

[+] Trispuffer:

Lösung A (1 Teil)		Lösung B (9 Teile)	
D-Glukose	1000 mg	NaCl	8,190 mg
$CaCL_2$ ($2H_2O$)	7,4 mg		
$MgCl_2$	199,2 mg		
KCl	402,6 mg		
TRIS	17565 mg		
aqua dest. ad 1000 ml		aqua dest. ad 1000 ml	
auf pH 7,6 einstellen.			

Die Zellzahl wird auf 1 x 10^7 Zellen pro ml eingestellt. Die sehr kleinen Organe junger Küken werden nach dem 'Zupfen' noch durch Zellsiebe (Maschenweite: 0,75 x 0,75 mm) gedrückt, wodurch die Zellausbeute stark erhöht wird, zugleich sinkt aber die Lebensfähigkeit (80 - 85 %).

2.2.3 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest

2.2.3.1 Methode A nach Ewald u.a. (26)

Nach 5maligem Waschen in 0,85 %iger NaCl-Lösung wird eine 5 %ige und eine 0,5 %ige Schaferythrozytenlösung in Medium hergestellt. Zur Koppelung wird die oben bestimmte subagglutinierende Anti-Schaferythrozyten-Serum-Verdünnung (1 : 150) verwendet. Gleiche Volumina einer 5 %igen Schaferythrozytensuspension und der Serumverdünnung werden bei 37° C 30 - 60 min im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wird dieser Erythrozyten-Antikörper-Komplex (EA-Komplex) einmal in 0,85 %iger NaCl-Lösung gewaschen, bei 1500 UpM abzentrifugiert und eine 0,5 % EA-Komplexsuspension eingestellt. Als Kontrolle wird eine 0,5 %ige Schaferythrozytensuspension bei jedem Test unter gleichen Bedingungen verwendet.
Jeweils 0,5 ml Zellsuspension (5 x 10^6 Zellen) werden mit 0,5 ml 0,5 %iger EA-Komplexsuspension in konisch zulaufenden Glasröhrchen (14 x 95 mm, Fa. Bellco, Schweiz) bei 37° C 30 min im Schüttelbad inkubiert. Im Gegensatz zur Vorschrift von Ewald u.a. (26) wird anschließend bei 300 UpM 5 min zentrifugiert und bei 4° C 20 Stunden

stehengelassen, bevor die Rosetten ausgezählt werden (Siehe Voruntersuchung 2.3).

2.2.3.2 Methode B nach Ewald und Sanders (28)

Nach Inkubation mit Carbonyleisen (vgl. 2.2.2.1.2) wird der EA-Rosettentest, wie oben beschrieben (2.2.3.1), durchgeführt; es werden 1 ml Zellsuspension und 1 ml EA-Komplexsuspension verwendet. Nach Inkubation im Schüttelbad für 30 min bei 37° C wird die Suspension auf 2 ml Ficoll-paque geschichtet und 15 min bei 1800 UpM zentrifugiert. Die rosettenbildenden Zellen des Niederschlags werden im Anschluß mikroskopisch ausgezählt.

2.2.4 Aktiver Rosettentest

Die zu untersuchenden Tiere werden mit 0,25 ml einer 20 %igen Schaferythrozytensuspension am ersten und 0,5 ml am dritten Tag immunisiert. Am siebten Tag werden ca. 9 ml Blut abgenommen und wie unter 2.2.2.1.1 behandelt. Jeweils 0,5 ml der Zellsuspension (5 x 10^6 Zellen) werden mit 0,5 ml einer 0,5 %igen Schaferythrozytensuspension in konisch zulaufenden Glasröhrchen unter den bei 2.2.3.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert.

2.2.5 Auszählung

Die Auszählung erfolgt nach Anfärbung mit 0,5 - 1 ml

Natt-Herrick-Reagenz[+] (64) bei 480facher Vergrößerung. Die angefärbte Zellsuspension wird dazu mit einer Pasteurpipette mehrmals vorsichtig (ohne Luftblasen) aufgewirbelt. Zwei bis drei Tropfen der angefärbten Lösung werden auf einen Objektträger verbracht, mit einem Deckglas abgedeckt und ausgezählt. Lymphozyten, die drei und mehr Erythrozyten an ihrer Oberfläche binden, gelten als Rosetten. 200 - 300 Lymphozyten werden ausgezählt und die rosettenbildenden Zellen pro 100 ausgezählte Lymphozyten angegeben. Durch eine mechanische Tastatur, wie sie auch zur Auszählung von Differentialblutbildern verwendet wird, können diese Prozentangaben leicht berechnet werden.

2.2.6 Immunelektrophorese und einfache radiale Immundiffusion

Zur routinemäßigen Unterscheidung von erblich dysgammaglobulinämischen und normogammaglobulinämischen Hühnern der Linie B 12 wird die Immunelektrophorese nach Scheidegger (76) und die einfache radiale Immunidffusion nach Gruber (34) durchgeführt.

[+] Natt-Herrick-Reagenz:

NaCl	3,88 g
$Na_2SO_4(10H_2O)$	2,5 g
$Na_2HPO_4(12\ H_2O)$	2,91 g
KH_2PO_4	0,25 g
Formalin (37 %)	7,5 ml
Methylviolett 2B	0,1 g

in aqua bidestillata auf 1000 ml

2.2.7 Rosettenhemmung mit IgG und IgM

Die Ig-Präparation aus Hühnerserum werden nach Bohner (13) durchgeführt; nach der Entfettung und Dialyse erfolgt die Aussalzung durch Natriumsulfatfällung. Danach wird die Rohfraktion durch Säulenchromatographie weiter aufgetrennt (13). Ein ml der Zellsuspension (1×10^7 Zellen) und 1 ml der, die jeweiligen Konzentrationen enthaltenen Proteinlösung, werden 40 min bei 37° D im Schüttelbad inkubiert. Die IgG- und IgM-Fraktionen sind weder hitzeaggregiert, noch sedimentiert. Danach wird bei 800 UpM 10 min abzentrifugiert und 3 x mit Medium gewaschen. Der EA-Rosettentest wird anschließend nach der Methode B durchgeführt.

2.2.8 Rosettenhemmung durch Anti-Huhn-B- und -T-Seren

Durch zweimalige Injektion von Bursa- beziehungsweise Thymuszellen des Huhnes in Kaninchen (1×10^9 Zellen pro Tier) werden Anti-Huhn-B- und -T-Seren gewonnen, die zum Nachweis der B- oder T-Zellabhängigkeit der EA-rosettenbildenden Zellen dienen, indem die Präinkubation (jeweils 1 ml Zellsuspension mit 1 ml Antiserumverdünnung und 20 µl Meerschweincomplement 30 min bei 37° C) vor dem EA-Rosettentest zur Verminderung der entsprechenden Zellpopulation führt. Damit werden auch die von dieser Population gebildeten EA-Rosetten verringert. Die Antiseren werden bei 56° C 45 min lang inaktiviert, anschließend mehrmals mit Bursa- beziehungsweise mit Thymuszellen von Eintagsküken und mit Hühnererythrozytenmembranen absorbiert.

2.2.9 Statistische Methoden (73)

Abhängig von der Prüfung auf Normalität und Varianzhomogenität wurde der Student's $\hat{t}$-Test und der $\hat{u}$-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney für den Vergleich unabhängiger Mittelwerte durchgeführt. Zur Bestimmung des Einflusses der IgG- beziehungsweise IgM-Präinkubation und der Wirkung der Anti-B- und Anti-T-Seren auf die Rosettenbildung wurde die lineare Regression und der Korrelationskoeffizient berechnet.

2.3 Voruntersuchungen

Während der einzelnen Versuche wurde der Subagglutinationstiter (siehe 2.2.1.2) mehrmals überprüft, auch wurden die Schaferythrozyten mit unterschiedlichen Anti-Schaferythrozyten-Serumverdünnungen gekoppelt; dabei wurde der Subagglutinationstiter von 1 : 150 bestätigt. Zu hohe Serumkonzentrationen führten zu Formveränderungen und Zerstörung der Erythrozyten; zu niedrige verminderten die Rosettenzahlen. Nach der Inkubation der Erythrozyten mit dem Antiserum führte zu häufiges Waschen und zu hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten zu Erythrozytenverklumpungen, die sich sehr nachteilig auf die Auswertung ausgewirkt haben. Es zeigte sich, daß der EA-Komplex altert, so daß an jedem Testtag der EA-Komplex neu hergestellt werden mußte. Die Einstellung einer 0,5 %igen EA-Komplexsuspension war lange Zeit problematisch und wurde schließlich durch Farbintensitäts-

vergleich mit der 0,5 %igen Schaferythrozytensuspension, die dem Kontrollversuch diente, erreicht.

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurden verschiedene Testbedingungen verglichen: Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (4^{o}, 37^{o} C), im Schüttelbad oder bei Ruhe, sofortige Auswertung oder Auswertung nach Zentrifugation und Inkubation über Nacht bei 4^{o} C. Dabei erwiesen sich die unter 2.2.3.1 angeführten Versuchtsbedingungen als optimal.

Das allgemein in der Literatur angegebene Verhältnis von Erythrozyten zu Lymphozyten von 7 - 10 zu 1 erwies sich auch in diesem Fall als günstig.

Bei der Auszählung war die Objektträgerzählung der Zählkammer überlegen. Der Zwischenraum zwischen Kammerboden und Deckglas schien so eng zusammengepreßt zu werden, daß die auf den Lymphozyten sitzenden Erythrozyten abgerissen wurden. Auf dem Objektträger dagegen konnte eindrucksvoll gesehen werden, wie die Rosetten in der Strömung mitgeschwemmt wurden und in den engeren Räumen am Rande des Deckglases hängenblieben.

Die Untersuchung von Milz-, Bursa- und Thymuszellen von Kontrollhühnern ergab einen ähnlichen altersabhängigen Verlauf wie bei Ewald, Freedman und Sanders (26), wenn auch quantitative Unterschiede auftraten.

3 Ergebnisse

3.1 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest nach Methode A

3.1.1 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest an Zellen des peripheren Blutes (siehe Fig. 1, sowie Tab. 1a und 1b)

In Fig. 1 wird die absolute Häufigkeit rosettenbildender Zellen der drei Versuchsgruppen dargestellt. Auf der Grundlage eines Mittelwertsvergleiches (Tab. 1a) aller Altersstufen kann festgestellt werden, daß ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) der Gruppe der erblich dysgammaglobulinämischen Hühner sowohl zu der Gruppe der normogammaglobulinämischen, als auch der Kontrolltiere besteht, während sich die beiden zuletzt genannten Gruppen nicht voneinander unterscheiden.

Wie aus Tab. 1b ersichtlich ist, bestehen signifikante Unterschiede ($p < 0,002$ bis $0,05$) zwischen den verschiedenen Altersstufen der Gruppe der dysgammaglobulinämischen Hühnern zu den entsprechenden Altersstufen der Gruppe der nomogammaglobulinämischen und Kontrollhühnern. Zwischen diesen beiden Gruppen treten keine Unterschiede auf.

Beim Vergleich der Altersstufen innerhalb der Versuchsgruppen zeigt sich ein Anstieg der rosettenbildenden Zellen bei den über 12 Monate alten, erblich dysgammaglobulinämischen Hühnern zu den beiden anderen Altersgruppen ($p < 0,05$). Bei den normogammaglobulinämischen und Kontrollhühnern ist dies nicht der Fall.

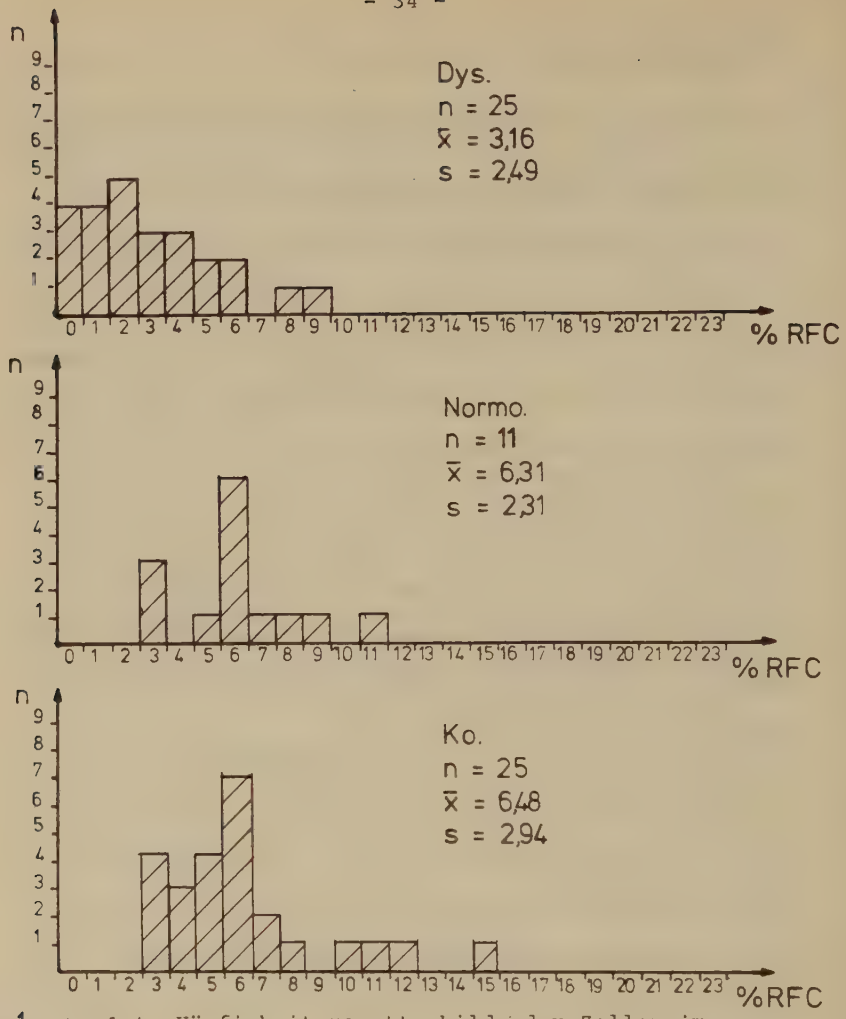


Fig. 1 Absolute Häufigkeit rosettenbildender Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.), normogammaglobulinämischer (Normo.) Hühner der Linie B 12 und nicht typisierter Kontrollhühner (Ko.). n, $\bar{x}$ und s aus Tab. 1a.

% RFC - Rosettenbildende Zellen in Prozent.

GESAMTVERGLEICH		
Dys.	Normo.	Ko.
n = 25 $\bar{x}$ = 3,16 s = 2,49	n = 11 $\bar{x}$ = 6,31 [1] s = 2,31	n = 25 $\bar{x}$ = 6,48 [1] s = 2,94

Tab. 1a. Mittelwertsvergleich ($\bar{x}$) rosettenbildender Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.), normogammaglobulinämischer (Norm.) und Kontrollhühner (Ko.). EA-Rosettentest nach Methode A (2.2.3.1).

[1] Statistisch signifikante Differenz $p < 0,001$ bezogen auf Dys.

ALTERSVERGLEICH							
über 12 Monate		4-6 Monate			1-4 Monate		
Dys.	Ko.	Dys.	Normo.	Ko.	Dys.	Normo.	Ko.
n = 8 $\bar{x}$ = 5,40 s = 2,39	n = 8 $\bar{x}$ = 8,34 [2] s = 3,86	n = 8 $\bar{x}$ = 1,62 [4] s = 0,70	n = 8 $\bar{x}$ = 5,38 [3] s = 3,31	n = 8 $\bar{x}$ = 5,78 [3] s = 1,79	n = 9 $\bar{x}$ = 2,54 [4] s = 2,33	n = 4 $\bar{x}$ = 7,00 [2] s = 1,41	n = 9 $\bar{x}$ = 5,4 [2] s = 2,43

Tab. 1b. Mittelwertsvergleich ($\bar{x}$) rosettenbildender Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.), normogammaglobulinämischer (Normo.) und Kontrollhühner (Ko.) in Abhängigkeit vom Alter. EA-Rosettentest nach Methode A (2.2.3.1).

[2] $p < 0,05$ Statistisch signifikante Differenz bezogen auf

[3] $p < 0,002$ Dys. innerhalb der Altersgruppe.

[4] $p < 0,05$ Statistisch signifikante Differenz bezogen auf Dys., älter als 12 Monate.

$\bar{x}$ und s sind als Prozent rosettenbildende Zellen angegeben.

3.2 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest nach Methode B

3.2.1 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest an Zellen des peripheren Blutes (siehe Fig. 2, sowie Tab. 2a und 2b)

In Fig. 2 wird die absolute Häufigkeit rosettenbildender Zellen der drei Versuchsgruppen dargestellt. Beim statistischen Vergleich ($\hat{t}$-Test) der Mittelwerte aus Tab. 2a lassen sich keine signifikanten Unterschiede finden. Beim Vergleich innerhalb der Altersgruppen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den erblich dysgammaglobulinämischen, normogammaglobulinämischen und Kontrollhühnern festzustellen.

3.2.2 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest bei keimfrei gehaltenen Küken (siehe Fig. 3)

Die Blutlymphozyten keimfrei gehaltener Küken bilden sehr wenig EA-Rosetten (1,7 %), wobei ältere Tiere höhere Prozentzahlen aufweisen (2,5 %). Die Injektion von Freund's Complete Adjuvans (FCA), beziehungsweise Humanem Serum Albumin (HSA) ergibt mit 2,8 % beziehungsweise 3,0 % rosettenbildender Zellen eine geringe Steigerung. Eine Woche nach der Konventionalisierung dieser Küken finden sich Werte von 9,1 %, die etwas höher als die Werte gleichaltriger, konventionell gehaltener Hühner sind.

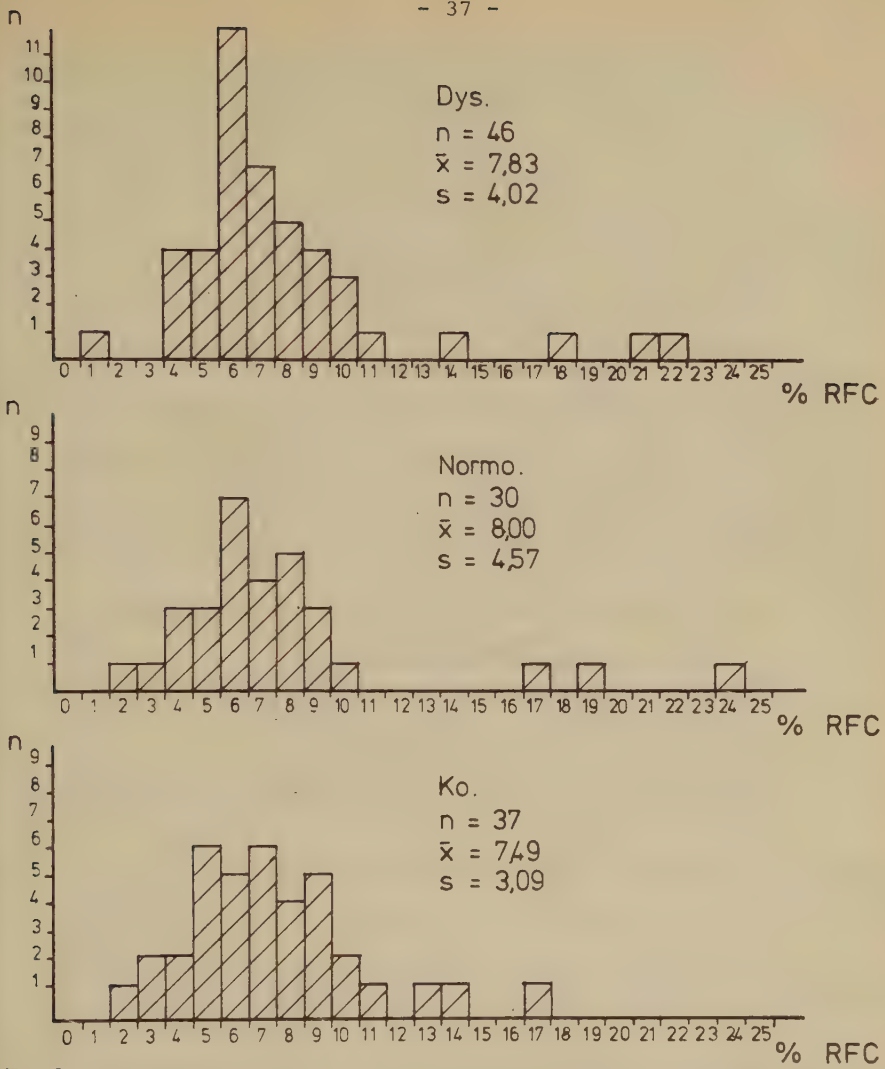


Fig.2 Absolute Häufigkeit rosettenbildender Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.), normogammaglobulinämischer (Normo.) Hühner und Kontrollhühner (Ko.). EA-Rosettentest nach der Methode 2.2.3.2. n, $\bar{x}$ und s aus Tab. 2a.

% RFC - Rosettenbildende Zellen in Prozent.

GESAMTVERGLEICH		
Dys.	Normo.	Ko.
n = 46 $\bar{x}$ = 7,83 s = 4,02	n = 30 $\bar{x}$ = 8,00 s = 4,57	n = 37 x = 7,49 s = 3,09

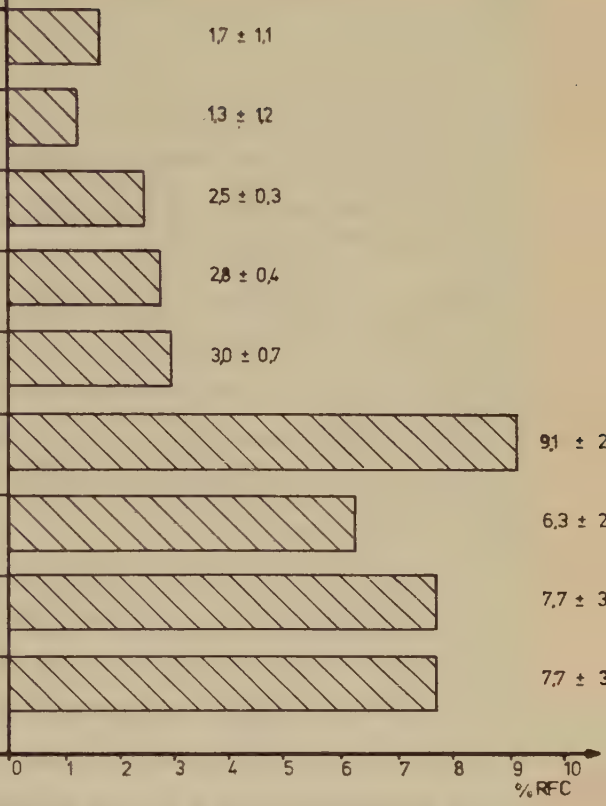
Tab. 2a. Mittelwertsvergleich ($\bar{x}$)rosettenbildender Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.), normogammaglobulinämischer (Normo.) und Kontrollhühner. EA-Rosettentest nach Methode B (2.2.3.2). Keine signifikanten Differenzen der Mittelwerte.

ALTERSVERGLEICH					
3-5 Monate			1-2 Monate		
Dys.	Normo.	Ko.	Dys.	Normo.	Ko.
n = 29 $\bar{x}$ = 8,92 s = 4,43	n = 18 $\bar{x}$ = 8,28 s = 5,08	n = 20 $\bar{x}$ = 7,33 s = 3,07	n = 17 $\bar{x}$ = 6,27 s = 2,14	n = 12 $\bar{x}$ = 7,67 s = 3,85	n = 17 $\bar{x}$ = 7,68 s = 3,19

Tab. 2b. Mittelwertsvergleich ($\bar{x}$) rosettenbildender Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.), normogammaglobulinämischer (Normo.), und Kontrollhühner (Ko.) in Abhängigkeit vom Alter. EA-Rosettentest nach der Methode B (2.2.3.2). Keine signifikanten Differenzen der Mittelwerte.

$\bar{x}$ und s sind als Prozent rosettenbildende Zellen angegeben.

Nr.	BEHANDLUNG	Tier-zahl
a	KEIMFREI 5 und 12 Wochen alt	9
b	KEIMFREI 5 Wochen alt	6
c	KEIMFREI 12 Wochen alt	3
d	KEIMFREI FCA	4
e	KEIMFREI HSA	5
f	KONVENTIONALISIERT FCA und/oder HSA	9
g	KONVENTIONELL Dys.	17
h	KONVENTIONELL Normo.	12
i	KONVENTIONELL Ko.	17



3.

EA-Rosettentest nach Methode B (2.2.3.2) an peripheren Blutlymphozyten keimfrei gehaltener und konventionalisierter HNL-Küken. Das Untersuchungsalter betrug, sofern nicht anders angegeben, 5 Wochen.

a = Mittelwert aus b und c.
d = 0,5 ml FCA i.m. 14 Tage vor der Konventionalisierung.
e = 40 mg/kg KG i.m. HSA in der 3. Lebenswoche.
f = 7 Tage nach der Konventionalisierung, FCA und HSA wie bei d und e.
g, h. i = Vergleichswerte aus Tab. 2b. (jeweils Altersgruppe 1 - 2 Monate).

% RFC - Rosettenbildende Zellen in Prozent.

3.2.3 Präinkubation von Immunglobulin-G und -M (siehe Fig. 4)

Es wird untersucht, ob die Präinkubation mit IgG, beziehungsweise IgM, die EA-Rosettenbildung peripherer Blutlymphozyten beeinflußt. Dazu werden, wie unter 2.2.7 angegeben, steigende Konzentrationen von IgG, beziehungsweise IgM, zugegeben. Da verschiedene Ausgangswerte (Prozentsatz rosettenbildender Zellen ohne Ig-Präinkubation) vorliegen, ist die lineare Regression berechnet, um eine Vergleichsmöglichkeit zu erhalten. Dabei zeigt es sich, daß die EA-Rosetten und die IgG-Menge negativ korreliert sind (-0,03).
Da Chiao, Lifter, Good und Choi (21) vergleichbare Hemmversuche durchführten, ist nach ihren Werten ebenfalls eine lineare Regression berechnet, um so die Ergebnisse besser vergleichen zu können und um die Übereinstimmung anschaulicher darstellen zu können.
Die Präinkubation von IgM ergibt weder bei den erblich dysgammaglobulinämischen, noch bei den Kontrollhühnern eine wesentliche Beeinflussung der Rosettenbildung.

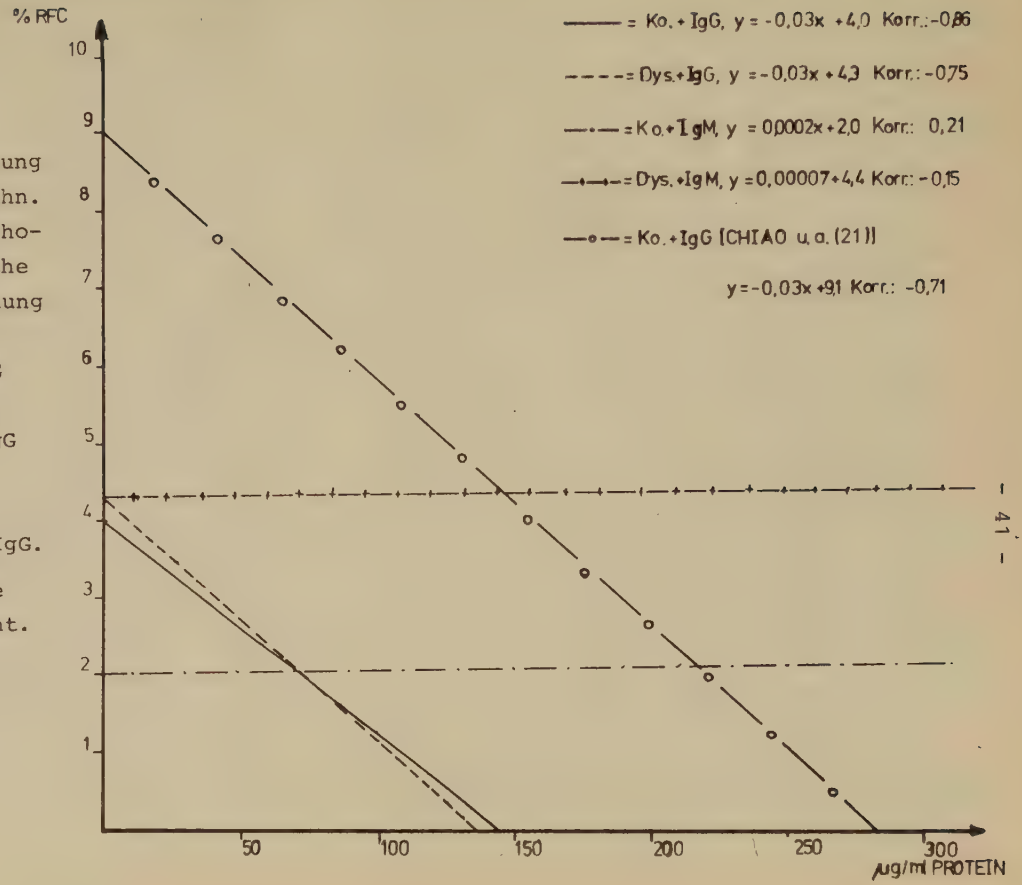
3.2.4 Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest nach Vorbehandlung mit Anti-B- und Anti-T-Seren (siehe Fig. 5)

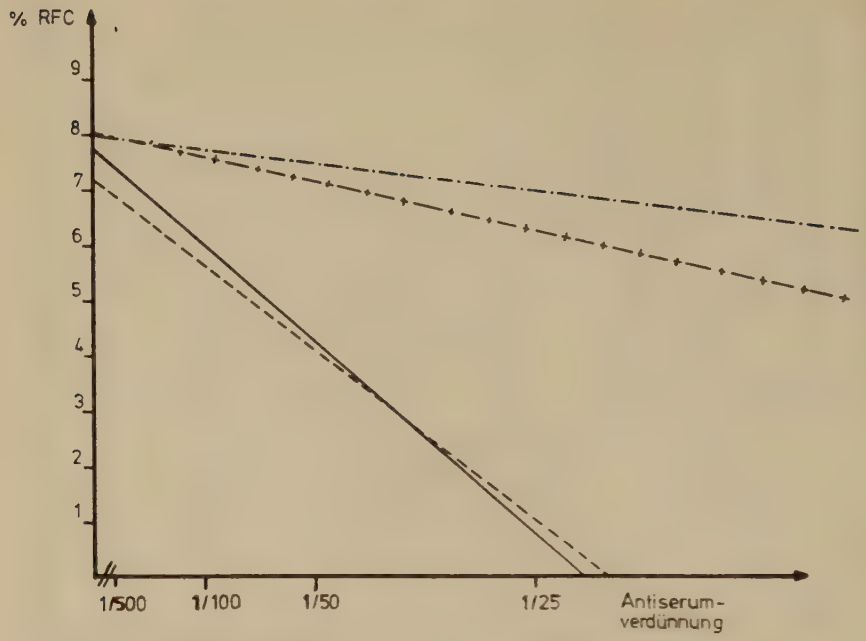
Der Einfluß der Präinkubation (vgl. 2.2.8) unterschiedlicher Verdünnungen von Anti-Huhn-B- bzw. -T-Seren auf die Rosettenbildung peripherer Blutzellen von dysgamma-

Fig. 4.

Hemmung der Rosettenbildung durch IgG und IgM vom Huhn. EA-Rosettentest nach Methode B (2.2.3.2). Graphische Darstellung nach Berechnung der linearen Regression.
Ko. + 22 - 330 µg/ml IgG bzw. IgM.
Dys. + 22 - 330 µg/ml IgG bzw. IgM.
Bei Chiao u.a. (21)
Ko. + 0,03 - 332 µg/ml IgG.

% RFC - Rosettenbildende Zellen in Prozent.





% RFC - Rosettenbildende Zellen in Prozent.

	Symbol	Antiserum	Verdünnungen 1/25	1/50	1/100	1/500	ohne Anti-serum	Regression y = ax + b	Korre-lation
Dys.	- - - -	Anti - B	1,5	3	5,5	7	9	y = -1,74x + 7,7	-0,94
	- + - + -	Anti - T	7	6	7	8	9	y = -0,44x + 8,0	-0,63
Ko.	———	Anti - B	1,5	3	6	6,5	8	y = -1,56x + 7,3	-0,95
	- · - · -	Anti - T	7	7,5	7,5	8	8	y = -0,25x + 7,9	-0,96

Fig. 5. Prozentuale Darstellung rosettenbildender Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.) und Kontrollhühner (Ko.) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an Anti-Huhn-B- bzw. -T-serum.

globulinämischen und Kontrollhühnern wird untersucht. Die Berechnung der linearen Regression und die graphische Darstellung (Fig. 5) zeigen, daß die EA-Rosettenbildung von Anti-Huhn-B-Serum mit ansteigenden Konzentrationen verringert wird, und zwar bei dysgammaglobulinämischen (von 9 auf 1,9 %) und Kontrollhühnern (von 8 auf 1,5 %) gleichartig. Anti-Huhn-T-Serum zeigt diese Verringerung in wesentlich geringerem Maß (von 9 auf 7 %, beziehungsweise von 8 auf 7 %). Das eingesetzte Anti-Huhn-B-Serum besitzt ausschließlich B-Zellspezifität, während das Anti-Huhn-T-Serum neben der T-Zellspezifität noch eine minimale Antikörperaktivität gegenüber B-Zellen aufweist.

3.3 Aktiver Rosettentest (siehe Tab. 3)

Der aktive Rosettentest, der nach der unter 2.2.4 beschriebenen Methode an Zellen des peripheren Blutes von 45 Hühnern im Alter von 4 - 5 Monaten durchgeführt wird, ergibt keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Mittelwerte der erblich dysgammaglobulinämischen Hühner mit den normogammaglobulinämischen Hühnern und Kontrolltieren.

Dys.	Normo.	Ko.
n = 15	n = 15	n = 15
$\bar{x}$ = 24,3	$\bar{x}$ = 19,7	$\bar{x}$ = 21,3
s = 5,0	s = 7,1	s = 6,9

Tab. 3. Mittelwertsvergleich ($\bar{x}$) der aktiv rosettenbildenden Zellen im peripheren Blut dysgammaglobulinämischer (Dys.), normogammaglobulinämischer (Normo.) und Kontroll-Hühner (Ko.). Keine statistisch signifikanten Unterschiede swe Mittelwerte.

$\bar{x}$ und s sind in Prozent rosettenbildende Zellen angegeben.

4. Diskussion

4.1 Besprechung der Methoden

Eine der Voraussetzungen für die Durchführung des EA-Rosettentests ist die Herstellung eines Anti-Schaferythrozyten-Serums und die Bestimmung des Subagglutinationstiters zur Sensibilisierung der Erythroryten. Zum einen darf die Serumkonzentration nicht zu hoch sein, da es dann zur unspezifischen Agglutination von Erythrozyten kommt, die das Ergebnis verfälscht. Zum anderen würde eine zu geringe Serumkonzentration die Sensitivität einschränken und keine optimale Rosettenbildung ermöglichen. Eine unspezifische Agglutination nach Inkubation über Nacht (siehe 2.2.3.1) kann nicht ausgeschlossen werden. Laskov (52) bietet hier eine Beurteilungshilfe; er fand im allgemeinen im Zentrum eines Erythrozytenaggregates eine immunkompetente Zelle, wenn der Durchmesser des Aggreagtes das Vier- und Mehrfache eines Erythrozyten betrug. Eine solche Formation wurde in der Folge als Rosette angesehen (siehe Foto 3 und 4).
Zur größtmöglichen Schonung des erblich dysgammaglobulinämischen Tierstammes wurde der Rosettentest vornehmlich mit Zellen des peripheren Blutes, nicht mit Zellen lymphatischer Organe durchgeführt. Bei älteren Tieren erwies sich die Gewinnung der Blutlymphozyten durch die Langsamzentrifugation (2.2.2.1.1) als ausreichend. Bei jüngeren Tieren (< 4 Wochen) konnte, aufgrund der geringeren Ausgangsblutmenge, nur durch die von Ewald u.a.

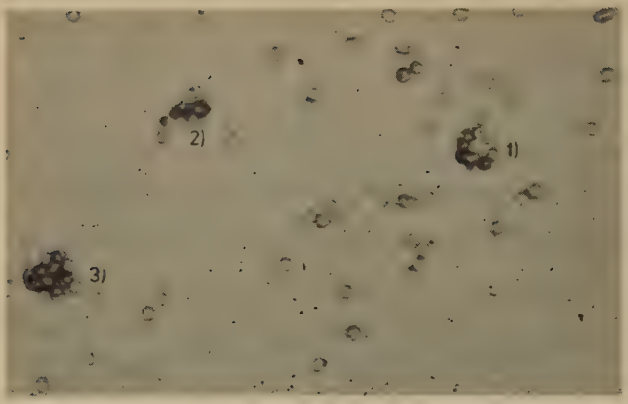


Foto 3) Ausschnitt mit 3 EA-Rosetten.
1) eindeutige EA-Rosette
2) EA-Rosette mit seitlich anhängendem 'Erythrozytenaggregat'.
3) 'Erythrozytenaggregat', nach Laskov (52) als Rosette bewertet.
Durch Spielen mit der Mikrometerschraube kann manchmal bei kritischen Formationen noch ein Lymphozyt entdeckt werden.

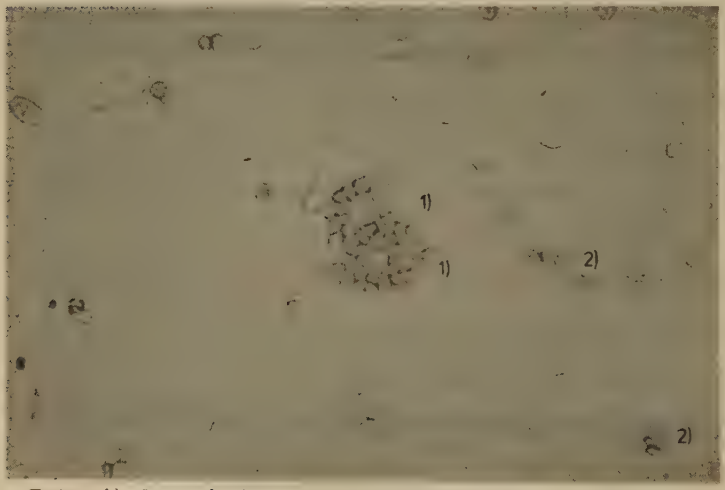


Foto 4) Ausschnitt mit 2 EA-Rosetten.
1) eindeutige EA-Rosetten mit mehrschichtig angelagerten Erythrozyten.
2) unspezifische Erythrozytenaggregate.

(28) nach Boyum (14) beschriebene Methode (2.2.2.1.2), eine für den Rosettentest ausreichende Zelldichte (1×10^7/ml) erreicht werden. Diese Methode hat durch die Präinkubation der Zellsuspension mit Carbonyleisen weiterhin den Vorteil, daß der Anteil phygozytierender Zellen an der Rosettenbildung sehr stark verkleinert wird, wie von mehreren Autoren gezeigt werden konnte (80, 28, 21).

Die anschließend an den Rosettentest erfolgte neuerliche Zentrifugation über einen Ficoll-paque-Gradienten führt zu einer weiteren Optimierung (vgl. 28). Auch erscheint die sofort im Anschluß an die Zentrifugation erfolgte Auszählung vom Versuchsablauf her vorteilhafter. Deshalb wurde nach anfänglicher Ausführung des Rosettentests nach der Methode A (2.2.3.1) ein zweiter vergleichender Versuchsansatz mit Hilfe der Methode B (2.2.3.2) durchgeführt. Auf die Diskrepanz der Ergebnisse, die bei der vergleichenden Auswertung nur bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern auftraten, wird weiter unten eingegangen.

Der EA-Rosettentest stellt eine einfache, schnelle und wenig apparativen Aufwand erfordernde Methode zur Untersuchung immunkompetenter Zellen dar. Die Schwierigkeiten der Rosettentechnik, die die Vergleichbarkeit einschränken, sind die Unterschiede in den Anteilen reagierender Zellen, die meist den Variationen von Spendern, Technik und Reagenzstandardisierung zugeschrieben wird (8).

Diese Einschränkung wird von Ewald u.a. (26) bestätigt,

die bei der Untersuchung der Milzzellen gleichaltriger Tiere individuelle Schwankungen von 1,3 - 12,1 % feststellten. Auch wir fanden bei der mehrmaligen Untersuchung der Blutlymphozyten zweier klinisch gesunder Tiere in unterschiedlichen Abständen erhebliche Schwankungen (9,4 - 23,7 %). Es scheint, daß die Rosettenbildung durch klinisch inapparente Abwehrvorgänge beeinflußt wird. So zeigte auch die Untersuchung der Rosettenbildung von Milzzellen zweier moribunder Tiere sehr hohe Werte (32 % und 24 %). Um diese individuellen Schwankungen auszugleichen, wurde versucht eine große Anzahl von Tieren zu untersuchen. Aus diesem Grund erfolgte bei der statistischen Berechnung keine Ausreißerbereinigung; außerdem ist der $\hat{t}$-Test bei der Abweichung von der Normalverteilung sehr robust, wenn die Gruppen mehr als 10 Individuen aufweisen und in der gleichen Größenordnung vorliegen (73). Der Nachteil der Rosettentechnik besteht einerseits in diesen individuellen Schwankungen, andererseits spielen auch subjektive Momente eine Rolle; so die Wahl des mikroskopischen Bildausschnittes oder die unterschiedliche Beurteilung kritischer Formationen durch verschiedene Untersucher, wodurch eine Standardisierung nur bis zu einem bestimmten Grad möglich ist.

Um uns zu versichern, daß trotz dieser Einwände eine weitgehende Reproduzierbarkeit des EA-Rosettentests gegeben ist, untersuchten wir unter identischen Bedingungen die von Ewald u.a. (26) beschriebene Kinetik EA-

Rosetten-bildender Zellen im Verlauf der Ontogenese (16. Embryonaltag bis 6. Lebenswoche). Der von Ewald u.a. (26) gefundene typische Verlauf - extrem hohe Werte in der Bursa während der Embryonalzeit, mit schlagartigem Abfall nach dem Schlupf und nachfolgendem kontinuierlichem Ansteigen der Werte in der Milz - konnte auch von uns festgestellt werden. Außerdem wurden in mehr als 30 Fällen parallel zu den peripheren Blutlymphozyten Milzzellen auf EA-Rosettenbildung untersucht. Der durchschnittliche individuelle Unterschied war kleiner als $\pm$ 15 %.

4.2 Besprechung der Ergebnisse

Bei der Durchführung des EA-Rosettentest ist vor allem die Frage interessant, welche Zellpopulation durch diesen Text nachgewiesen wird. Die Meinungen darüber sind geteilt und haben sich im Laufe der Zeit gewandelt; zumindest ist der EA-Rezeptor kein eindeutiger B- oder T-Zellmarker (siehe auch 1.2.3 und 1.2.5). Einhelligkeit besteht darin, daß die EA-Rosettenbildung nicht durch Immunglobuline, sondern durch Membranrezeptoren verursacht wird. Da die Bindung mit dem Fc-Fragment des IgG's zustande kommt, wird dieser Rezeptor allgemein als Fc-Rezeptor bezeichnet. Ewald, Freedman und Sanders (26, 27) haben die Anwesenheit des Fc-Rezeptors auf Hühnerzellen erstmals nachgewiesen. Sie sehen in den EA-rosettenbildenden Zellen B-Zellen, weil sie in der Bursa heran-

reifen. Sie untersuchen nicht, ob die rosettenbildenden Zellen auch Oberflächenimmunglobuline tragen. Sie finden keine Beeinträchtigung der Rosettenbildung mit spezifischen Antiseren (Anti-leichte-Ketten, Anti-B-, Anti-T-Zellen).

De Kruyff u.a. (51) vermuten ebenfalls die B-Zellabhängigkeit der EA-rosettenbildenden Zellen, da nach Bursektomie wesentlich weniger EA-Rosetten gefunden werden als ohne Bursektomie. Diese Verminderung der Rosettenzahlen nach Bursektomie finden Chiao u.a. (21) und Ewald und Sanders (28) nicht.

Chiao u.a. (21) gehen davon aus, daß bursektomierte, agammaglobulinämische Hühner keine B-Zellen besitzen können und somit alle EA-Rosetten von T-Zellen gebildet werden müssen. Ewald und Sanders (28) dagegen argumentieren, daß, wenn Lymphozyten mit Fc-Rezeptoren wirklich B-Zellen darstellen, das Vorhandensein solcher Zellen in bursektomierten, agammaglobulinämischen Küken auf zwei Wegen erklärt werden kann: a) Die rosettenbildenden Lymphozyten in agammaglobulinämischen Küken sind Zellen, die die Bursa vor deren Entfernung beim Schlupf verlassen haben und die außerdem gegenüber Cyclophosphamid unempfindlich sind. Sie gehören entweder einer anderen Zelllinie an als die Zellen, die IgG synthetisieren können, oder sie repräsentieren Zellen eines frühen B-Zelldifferenzierungsstadiums, die nur unter dem Einfluß einer funktionstüchtigen Bursa weiterreifen können. b) Die zweite Erklärungsmöglichkeit liegt darin, daß die roset-

tenbildenden Lymphozyten agammaglobulinämischer Küken sich in sogenanten extrabursalen Geweben entwickeln. Diese extrabursalen Gewebe haben nur die Fähigkeit begrenzte B-Zellfunktionen in den Zellen zu erzeugen, die unter dem extrabursalen Einfluß reifen. Somit ist,nach der Meinung von Ewald und Sanders (28), die Expression des Fc-Rezeptors unabhängig von einem spezifischen Einfluß der Bursa Fabricii.

Unsere in Fig. 2 und Tab. 2a und 2b dargestellten Ergebnisse sprechen für einen ähnlichen Hintergrund der Genese Fc-Rezeptor-tragender Zellen bei erblich dysgammaglobulinämischen Hühnern wie er bei bursektomierten agammaglobulinämischen Küken von Ewald und Sanders (28) beschrieben wird.

Die erblich dysgammaglobulinämischen Küken zeigen auch - im Gegensatz zu normogammaglobulinämischen und Kontrollhühnern - einen völligen Mangel an Oberflächenrezeptoren vom IgG-Typ auf B-Zellen (41).

Einerseits liegen bei erblich dysgammaglobulinämischen Hühnern keine von der Norm abweichenden histomorphologischen Befunde des Bursagewebes vor (59). Andererseits sprechen alle eingangs erwähnten Charakteristika der in Frage stehenden Versuchstiere für einen Funktionsmangel der Bursa Fabricii.

Somit kann hinsichtlich der dysgammaglobulinämischen Tiere postuliert werden, daß entweder

a) eine extrabursale B-Zellreifung bis zur Ausprägung des Fc-Rezeptors, nicht aber bis zum IgG-Bildungsver-

vermögen der entsprechenden B-Zelle vorliegt, oder daß

b) die funktionsgestörte Bursa Fc-Rezeptor-tragende Zellen in ausreichender Anzahl produziert, ohne daß B-Zellen bis zur Fähigkeit der IgG-Synthese ausreifen können.

Bei den nach der Methode A durchgeführten Rosettentests sind signifikante Unterschiede im Prozentsatz rosettenbildender Zellen zwischen dysgammaglobulinämischen Hühnern und normogammaglobulinämischen und Kontrollhühnern aufgetreten (vgl. 3.1; Fig. 1 und Tab. 1a und 1b). Daraus kann entnommen werden, daß bei dysgammaglobulinämischen Hühnern entweder weniger Fc-Rezeptoren-tragende Zellen vorhanden sind, oder daß bei gleicher Anzahl Fc-Rezeptoren-tragender Zellen die Dichte der Rezeptoren geringer ist und so nur ein Teil der Zellen nachgewiesen werden kann. Dem stehen die Ergebnisse des nach Methode B durchgeführten Rosettentests gegenüber, wo keine signifikanten Unterschiede bezüglich der EA-Rosettenbildung zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt werden konnten. Entweder führt die Methode B zu einem empfindlicheren Testsystem und die einleitend (1.2.5; 36,78) besprochenen Unterschiede in der Rezeptorendichte einer Zelle - was für B-Zellen dysgammaglobulinämischer Hühner aufgrund der Ergebnisse nach Methode A zutreffen müßte - sind bedeutungslos geworden. Aus methodischer Sicht läßt sich vermuten, daß die Zentrifugation bei Methode A eher zur Abtrennung von schwächer gebundenen Erythrozyten

führt als die Zentrifugation über den Ficoll-paque-Gradienten bei Methode B.

Wenn nun unterstellt wird, daß bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern die Fc-Rezeptorendichte geringer ist, erscheint das überproportionale Ansteigen der EA-rosettenbildenden Zellen dieser Versuchsgruppe und die Diskrepanz der Ergebnisse von Methode A und B erklärbar. Vielleicht führt aber auch die Behandlung zur Eliminierung der phagozytierenden Zellen mit Carbonyleisen nur bei der Gruppe der dysgammaglobulinämischen Hühner zu einer Erhöhung der Rosettenbildungskapazität. Der von mehreren Autoren (vgl. Seite 50) beschriebene unterschiedliche Einfluß der Bursektomie auf die EA-Rosettenbildung - hochgradige Verringerung bei de Kruyff u.a. (51), kein Einfluß bei Chiao u.a. (21) und bei Ewald und Sanders (28) - könnte gleichfalls durch unterschiedliche Rosettentestmethoden bedingt sein:

Bei Vorbehandlung mit Carbonyleisen (21, 28) und Separierung über Ficoll-paque (21) liegt keine Differenz bezüglich der Anzahl EA-rosettenbildender Zellen zwischen der immuninsuffizienten (bursektomierten) und der Kontrollgruppe vor. Dagegen tritt ohne Eliminierung der phagozytierenden Zellen und bei Separierung über BSA (bovines Serum Albumin) eine starke Verminderung der EA-Rosettenbildungsfähigkeit bei der bursektomierten Gruppe auf (51).

Durch weitere Untersuchungen muß geklärt werden, ob sowohl bei spontan als auch bei experimentell immuninsuf-

fizienten Küken B-Zellen in ihrer EA-Rosettenbildungsfähigkeit durch methodische Einflüsse mehr gestört werden als B-Zellen immunologisch normaler Küken.
Die Tatsache, daß die Anzahl aktiver Rosetten sich in allen drei Versuchsgruppen, auch ohne Vorbehandlung mit Carbonyleisen, nicht unterscheiden, spricht nicht gegen diese Vorstellungen (siehe Tab. 3). Aktive Rosetten entstehen nicht aufgrund der Bindung durch den Fc-Rezeptor, sondern kommen durch Oberflächenantikörper von B-Zellen, die nach vorangegangener Immunisierung gebildet werden, zustande. Aus diesem Zusammenhang ist zu ersehen, daß auch Antikörper vom IgM-Typ (die, im Gegensatz zu IgG-Antikörpern, von den dysgammaglobulinämischen Hühnern gebildet werden können) bezüglich der aktiven Rosettenbildung ausreichend sein können.
Die Ergebnisse, die an keimfrei gehaltenen Küken erhoben wurden, lassen erkennen, daß der Fc-Rezeptor in einem funktionellen Zusammenhang mit Abwehrvorgängen steht, und daß er bei fehlendem oder geringem Antigenkontakt des Organismus nur ungenügend ausgebildet wird, beziehungweise, daß weniger Fc-Rezeptor-tragende Zellen in der Zirkulation erscheinen. Sowohl eine während der Keimfreihaltung erfolgte unspezifische Stimulierung mit einem Adjuvans (FCA) als auch eine antigenspezifische Stimulierung mit HSA erhöht den Prozentsatz EA-rosettenbildender Zellen (Fig. 3). Nach der Konventionalisierung kann die starke Belastung des Abwehrsystems eine überschießende Reaktion - wie sie für die Immunglobulin-

synthese nachgewiesen wurde (56) - und damit die höheren Werte EA-rosettenbildender Zellen erklären.
Aus Hemmversuchen mit IgG und IgM geht hervor, daß bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern wie bei den Kontrolltieren der Fc-Rezeptor von IgG- und nicht von IgM-Molekülen gehemmt wird (Fig. 4; vgl. 1.2.3 und 1.2.5). Er stellt damit eine IgG-Bindungsstelle dar.
Aus Ergebnissen, die durch die Eliminierung von B-, beziehungsweise T-Zellen nach Präinkubation mit Anti-Huhn-B-, beziehungsweise -T-Seren erzielt werden, geht hervor, daß es sich bei den EA-rosettenbildenden Zellen um B-Zellen handelt (Fig. 5).
Dies steht nicht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ewald u.a. (27), die durch Besetzung der B-spezifischen Oberflächenantigene keine Hemmung der EA-Rosettenbildung herbeiführen konnten.

Die unter 1.4 aufgeführten Fragen können jetzt wie folgt beantwortet werden:

1) Unter der Voraussetzung einer Methode, bei der Phagozyten eliminiert, über Ficoll-paque separiert und nach der Inkubation nochmals mit Ficoll-paque zentrifugiert wird, bestehen bezüglich der Erythrozyten-Antikörper-Rosettenbildungsfähigkeit keine Unterschiede zwischen erblich dysgammaglobulinämischen und normogammaglobulinämischen Hühnern der Linie B 12 und nicht B-typisierten Kontrolltieren.
2) Die Erythrozyten-Antikörper-Rosettenbildung wird auch bei den erblich dysgammaglobulinämischen Hühnern durch einen IgG-spezifischen Rezeptor verursacht.
3) Bei den Erythrozyten-Antikörper-Rosetten bildenden Zellen handelt es sich auch bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern um B-Zellen.
4) Die Keimfreihaltung von Kontrollhühnern führt zu einer starken Beeinträchtigung der Erythrozyten-Antikörper-Rosettenbildungskapazität.

5 Zusammenfassung

Mit Hilfe des Erythrozyten-Antikörper (EA)-Rosettentests nach Ewald, Freedman und Sanders (26) und Ewald und Sanders (28) werden Untersuchungen bezüglich Fc-Rezeptoren tragender Blutlymphozyten durchgeführt. Erblich dysgammaglobulinämische Hühner der Linie B 12 werden mit normogammaglobulinämischen Hühnern der Linie B 12 und Kontrollhühnern verschiedener Altersstufen verglichen. Dabei werden verschiedene Methoden verwendet. Werden die phagozytierenden Zellen nicht mit Carbonyleisen entfernt, unterscheiden sich die erblich dysgammaglobulinämischen signifikant von den normogammaglobulinämischen und Kontrollhühnern. Nach der Entfernung der phagozytierenden Zellen und Ficoll-Separierung werden zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt.

Keimfrei gehaltene Küken weisen einen geringeren Prozentsatz rosettenbildender Zellen im peripheren Blut auf.

Durch Präinkubation mit IgG und IgM kann gezeigt werden, daß der Fc-Rezeptor nur für IgG spezifisch ist.

Die Vorbehandlung mit Antiseren gegen Hühner-B- beziehungsweise -T-Zellen führt nur bei Einsatz von Anti-B-Seren zu einer signifikanten Verringerung der EA-Rosettenbildung. Anti-T-Seren erbringen keinen derartigen Effekt. Es kann geschlossen werden, daß, vornehmlich bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern, Fc-rezeptortragende und IgG-produzierende B-Zellen nicht identisch sein müssen.

6 Summary

Examinations respecting Fc receptor carrying peripheral blood lymphocytes are performed by the erythrocyte-antibody (EA) rosette assay as described by Ewald, Freedman and Sanders (26) and by Ewald and Sanders (28). Genuin dysgammaglobulinemic chickens of the B 12 line are compared with normogammaglobulinemic chickens of the B 12 line and with control-chickens of different ages. Thereby different methods are used. Without removing of phagocytes by carbonyl iron the genuin dysgammaglobulinemic chickens are significantly different from normogammaglobulinemic and control chickens. After removal of phagocyting cells and Ficoll-Separation there are no significant differences between the test groups.
Chicks, kept under germfree conditions, show a lower percentage of rosette forming peripheral blood cells.
The specificity of the Fc receptor only for IgG can be demonstrated by preincubation with IgG and IgM.
The pretreatment with antisera against chicken B and T cells shows that only anti-B-serum significantly diminishs the EA rosetteformation. Anti-T-serum has no comparable effect.
It can be concluded that, especially in dysgammaglobulinemic chickens, Fc receptor bearing and IgG producing B-cells have to be not identical.

7. Literaturverzeichnis

1. ALEXANDER, M. D., ANDREWS, J. A., LESLIE, R. G. Q., WOOD, N. J.:
The Binding of Human and Guinea Pig IgG Subclasses to Homologous Makrophage and Monocyte Fc-Receptors.
Immunology 35, 115 (1978)

2. ANDERSON, C. L., GREY, H. M.:
Receptors for Aggregated IgG on Mouse Lymphocytes. Their Presence on Thymocytes, Thymus-Derived and Bone-Marrow-Derived Lymphocytes.
J.Exp.Med. 139, 1175 (1974)

3. BACH, J. F., MULLER, J. Y., DARDENNE, M.:
In vivo Specific Antigen Recognition by Rosette Forming Cells.
Nature 227, 1251 (1970)

4. BÄCK, R., ALM, G. V.:
The Occurence of Spontaneous Rosette-Forming Cells in the Bursa of Fabricius and Spleen.
Eur.J.Immunol. 3, 58 (1973)

5. BASTEN, A., MILLER, J. F. A. P., SPRENT, J. PYE, J.:
A Receptor for Antibody on B Lymphocytes.
I. Method of Detection and Functional Significance.
J.Exp.Med. 135, 610 (1972)

6. BASTEN, A., WARNER, N. L., MANDEL, T.:
A Receptor for Antibody on B Lymphocytes.
II. Immunochemical and Electron Microscopy Characteristics.
J.Exp.Med. 135, 627 (1972)

7. BAXLEY, G., BISHOP, G. B., COOPER, A. G., WORTIS, H. H.:
Rosetting of Human Red Blood Cells to Thymocytes and Thymus-Derived Cells.
Clin.Exp.Immunol. 15, 385 (1973)

8. BECKETT, R. C., BANKHURST, A. D., VAN EPPS, D. E., WILLIAMS, R. C.:
Empiric Analysis of the Interactions Involved in the Formation of Fc Receptor Rosettes.
Int.Archs.Allergy appl.Immunol. 56, 65 (1978)

9. BIANCO, C., PATRICK, R., NUSSENZWEIG, V.:
A Population of Lymphocytes Bearing a Membrane Receptor for Antigen-Antibody-Complement Complexes.
J.Exp.Med. 132, 702 (1970)

10. BIANCO, C. NUSSENZWEIG, V.:
Theta-Bearing and Complement-Receptor Lymphocytes Are Distinct Populations of Cells.
Science 173, 154 (1971)

11. BIOZZI, G., STIEFFEL, C., MOUTON, D., LIACOPOULOS-BRIOT, M., DECREUSEFOND, D., BOUTHILLIER, Y.:
L'Immuno-Cyto-Adhérence.
Annales de l'Institut Pasteur 110 suppl. 3, 7 (1966)

12. BIRRIEN, J. L., MARTIN-TAIEB, C., BACH, J. F., LIACOPOULOS, P.:
Properties of Bispecific Rosette-Forming Cells II. Rosette Formation by 'Educates' T-Lymphocytes.
Ann.immunol.(Institut Pasteur) 162 C, 303 (1975)

13. BOHNER, H. J.:
Biologische Halbwertszeit und Umsatz von Immunglobulin-G normaler und dysgammaglobulinämischer Haushühner.
Dissertation, München (1977)

14. BOYUM, A.:
Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Centrifugation and of Granulocytes by Combing Centrifugation and Sedimentation at 1 g.
Scand.J.clin.Lab Invest. 21 (suppl. 97), 77 (1968)

15. van BOXEL, J. A., ROSENSTREICH, D. L.:
Binding of Aggregated Gamma-Globulin to Activated T Lymphocytes in the Guinea Pig.
J.Exp.Med. 139, 1002 (1974)

16. BRAIN, P., MARSTON, R. H.:
Rosette Formation by Human T and B Lymphocates.
Eur.J.Immunol. 3, 6 (1973)

17. BRÜGGEMANN, J., MERKENSCHLAGER, M., KIRCHNER, B., LÖSCH, U.:
Eine erbliche Hypo- beziehungsweise Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn.
Naturwissenschaften 54, 97 (1967)

18. BRÜGGEMANN, J., FRIEDRICH, B., LÖSCH, U.:
Vergleichende Bestimmungen der Immunglobulinspiegel genuin dysgammaglobulinämischer und 'hormonell bursektomierter' Hühner.
Z.Tierphysiol.,Tierern. und Futtermittelkde. 24, 317 (1969)

19. BRÜGGEMANN, J., FRIEDRICH, B., LÖSCH, U., SCHMID, D. O.:
Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer Hühner. I.Isohämagglutinine.
Z.Immun.-Forsch. 141, 280 (1971)

20. CHIAO, J. W., GOOD, R. A.:
Studies of the Presence of Membrane Receptors for Complement, IgG and the Sheep Erythrocyte Rosetting Capacity on the Same Human Lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 6, 157 (1976)

21. CHIAO, J. W., LIFTER, J., GOOD, R. A., CHOI, Y. S.:
The Fc Receptors on Chicken T Lymphocytes.
Cellular Immunology 40, 336 (1978)

22. DENT, P. B., GOOD, R. A.:
Absence of Antibody Production in the Bursa of Fabricius.
Nature 207, 491 (1965)

23. DICKLER, H. B., KUNKEL, H. G.:
Interaction of Aggregated Gamma-Globulin with B Lymphocytes.
J.Exp.Med. 136, 191 (1972)

24. DICKLER, H. B.:
Studies of the Human Lymphocyte Receptor for Heat Aggregated or Antigen-Complexed Immunoglobulin.
J.Exp.Med. 140, 508 (1974)

25. EARDLEY, D. D., SHEN, F. W., CONE, E. R., GERSHON, R. K.:
Antigen-Binding T Cells: Dose Response and Kinetic Studies on the Development of Different Subsets.
J.Immunol. 122, 140 (1979)

26. EWALD, S., FREEDMAN, L., SANDERS, B. G.:
EA Rosette Forming Lymphoid Cells: Distribution as to Cell Types and Organs from Chicken of Different Developmental Stages.
Cellular Immunology 23, 158 (1976)

27. EWALD, S., FREEDMAN, L., SANDERS, B. G.:
EA Rosette-Forming Lymphoid Cells in Chickens: Specificity of the Fc Receptor and its Relationship to Other Surface Antigens.
Immunology 31, 847 (1976)

28. EWALD, S., SANDERS, B. G.:
EA Rosette-Forming Cells in Chickens: Presence in Spleens of Bursektomized Chickens and Relationships to B Lymphocytes.
Developmental and Comparative Immunology 1, 363 (1977)

29. FELSBURG, P. J., EDELMAN, R.:
The active E-Rosette test:
A Sensitive in vitro Correlate for Human Delayed-Type Hypersensitivity.
J.Immunol. 118, 62 (1977)

30. FERRARINI, M., MORETTA, L., ABRILE, R., DURANTE, M. L.:
Receptors for IgG Molecules on Human Lymphocytes Forming Spontaneous Rosettes with Sheep Red Cells.
Eur.J.Immunol. 5, 70 (1975)

31. FIEDLER, H., LÖSCH, U., HÁLA, K.:
Establishment of a B compatible chicken line with Dysgammaglobulinaemia and Normogammaglobulinaemia.
Fol.Biol. Prag, im Druck.

32. FIEDLER, H., SCHEU, M., LÖSCH, U.:
Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) Reaction in Dysgammaglobulinemic B12 Chicken.
In Vorbereitung.

33. FROLAND, S. S., NATVIG, J. B.:
Identification of three Different Human Lymphocyte Populations by Surface Markers.
Transplantation Revue 16, 114 (1973)

34. GRUBER, F.:
Studien zur Bestimmung der Immunglobulinspiegel am Beispiel normaler gnotobiotischer und konventionalisierter Küken.
Dissertation, München (1968)

35. GUPTA, S., GOOD, R. A., SIEGAL, F. P.:
Rosette-Formation with Mouse Erythrocytes: II. A Marker for Human B and Non-T Lymphocytes.
Clin.Exp.Immunol. 25, 319 (1976)

36. HALLORAN, P., SCHIRRMACHER, V.:
Imunology of Receptors, Chapter 12.
Imunology Series 6, Ed. by CINADER, B.
Dekker XII, New York, Basel (1977)

37. HAN, T., MINOWADA, J.:
Enhanced E- and EAC'-Rosette Formation by Neuraminidase.
J.Immunol.Methods 12, 253 (1976)

38. HEMMINGSSON, E. J., ALM, G. V.:
The Effect of Embryonic Bursektomy on the Rosette-Forming Cells in the Chicken.
Eur.J.Immunol. 2, 379 (1972)

39. HERLYN, D. M., BOHNER, H. J., LÖSCH, U.:
IgG-Turnover in Dysgammaglobulinemic Chickens.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 1169 (1977)

40. HOFFMANN-FEZER, G., LÖSCH, U., HOFFMANN, R., SCHMAHL, W.:
Verminderung oberflächengebundener Immunglobuline auf Lymphozyten genuin dysgammaglobulinämischer Küken.
Z.Immun.-Forschung. 147, 61 (1974)

41. HOFFMANN-FEZER, G. u.a.:
Oberflächenimmunglobuline vom Typ IgG, IgM und IgA in den lymphatischen Geweben erblich dysgammaglobulinämischer Küken.
In Vorbereitung.

42. HUDSON, L., ROITT, M.:
Immunofluorescent Detection of Surface Antigens Specific to T and B Lymphocytes in the Chicken.
Eur.J.Immunol. 3, 63 (1973)

43. ISAKOVIĆ, K., PETROVIĆ, S., MARKOVIĆ, B. M., Janković, B. D.:
Natural Lymphocytic Rosettes in Non-Operates, Thymectomized and Bursectimized Chickens.
Experientia 30, 1204 (1974)

44. IVANYI, J., FUENSALIDA, E., LYDYARD, P. M.:
Rapid Recovery of Antigen-Binding Receptors on Chicken B Cells Following Anti-Ig-Serum Treatment.
Eur.J.Immunol. 6, 25 (1976)

45. JONDAL, M., HOLM, G., WIGZELL, H.:
Surface Markers on Human T and B Lymphocytes: I. A. Large Population of Lymphocytes Forming Non-Immune Rosettes with Sheep Red Blood Cells.
J.Exp.Med. 136, 207 (1972)

46. KISZKISS, D. F., CHOI, Y. S., GOOD, R. A.:
The Effect of Surgical Bursectomy and Irradiation on Rosette-Forming Cells in the Chicken.
J.Immunol. 109, 1405 (1972)

47. KLUMPNER, W.:
Immunglobulinverlauf in der postembryonalen Ontogenese bei erblich dysgammaglobulinamischen Küken.
Dissertation in Vorbereitung, München

48. KRAMMER, P. H. PERNIS, B.:
The Effect of Anti-Immunglobulin Antibodies on Fc Rosettes.
Scand.J.Immunol. 5, 199 (1976)

49. KRAMMER, P. H., PERNIS, B.:
Ia Antigens and Fc Receptors.
Scand.J.Immunol. 5, 205 (1976)

50. KRAMMER, P. H., ELLIOT, B. E., VON BOEHMER, H.:
Fc-Rosetting and Non-Rosetting T Cells Are Killer Cells.
Eur.J.Immunol. 6, 138 (1976)

51. DE KRUYFF, R. H., PONZIO, N. M., THORBECKE, G. J.:
Evaluation of the Possible Role of B Cell Receptors in the Tendency of B Cells to Migrate into Follicles in Mice and Chickens.
Eur.J.Immunol 7, 237 (1977)

52. LASKOV, R.:
Rosette Forming Cells in Non-Immunized Mice.
Nature 219, 973 (1968)

53. LAY, W. H., NUSSENZWEIG, V.:
Receptors for Complement on Leukocytes.
J.Exp.Med. 128, 991 (1968)

54. LEVY, J. D., KNIESER, M. R., BRIGGS, W. A.:
Ultrastructural Characteristics of the Non-Immune Rosette-Forming Cells.
J.Cell.Sci. 18, 79 (1975)

55. LO BUGLIO, A. F., COTRAN, R. S., JANDL, J. H.:
Red Cells Coated with Immunoglobulin-G: Binding and Sphering by Mononuclear Cells in Man.
Science 158, 1582 (1967)

56. LÖSCH, U., FRIEDRICH, B., RIEDEL, G.:
Die Immunglobulingehalte keimfreier Küken während der Konventionalisierung.
Z.für Versuchstierkunde 12, 58 (1970)

57. LÖSCH, U.:
Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinämie.
Habilitationsschrift Universität München (1972)

58. LÖSCH, U., HARTMANN, W., RIEDEL, G.:
Zur Antikörperproduktion Dysgammaglobulinämischer Hühner:
II.Präzipitierende Antikörper (Anti-HSA).
Z.Immun.Forschung 143, 16 (1972)

59. LÖSCH, U., HOFFMANN-FEZER, G.:
Vergleichende histologische und immunologische Untersuchungen an immunologisch defekten Hühnern.
II. Genuin dysgammaglobulinämische Hühner.
Zbl.Vet.Med.A. 20, 569 (1973)

60. MARTIN-TAIEB, C., LIACOPOULOS, P., BACH, J. F.:
Properties of Bispecific Rosette-Forming Cells.
I. Presence of T-Lymphocyte Markers.
Ann.Immunol.(Institut Pasteur) 126, 291 (1975)

61. MENDES, N. F., TOLNAI, M. E. A., SILVEIRA, N. P. A., GILBERTSEN, R. B. METZGAR, R. S.:
Technical Aspects of the Rosette Tests Used to Detect Human Complement Receptors (B)and Sheep Erythrocyte Binding (T) Lymphocytes.
I.Immunol. 111, 860 (1973)

62. MERCIER, P.:
The Rosettes and the Immuno-Cyto-Adhérence: Analytic Essay.
Biomedicine 20, 17 (1974)

63. MERKENSCHLAGER, M., LÖSCH, U., RIEDEL, G.:
Die Ursache der mit der ersten Keimbesiedlung auftretenden Wachstumsdepression des Kükens.
Tierärztliche Umschau 22, 132 (1967)

64. NATT, M. P., HERRICK, C. A.:
A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leukocytes of the Chicken.
Poultry Science 31, 735 (1952)

65. NOTA, N. R., LIACOPOULOS-BRIOT, M., STIEFFEL, C., BIOZZI, G.:
L'immuno-cyto-adhérence:
Une méthode simple et quantitative pour l'étude in vitro des cellules productrices d'anticorps.
Comptes Rendus Acad.Sc.Paris 259, 1277 (1964)

66. OBERDORFER, A., LÖSCH, U.:
Das sedimentationsanalytische Serumeiweißbild dysgammaglobulinämischer Hühner.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chemie 351, 1007 (1970)

67. VAN OERS, M. H. J., ZEIJLEMAKER, W. P., SCHELLEKENS, P. TH. A.:
Seperation and Propeties of EA-Rosette-Forming Lymphocytes in Humans.
Eur.J.Immunol. 7, 143 (1977)

68. PARASKEVAS, F., LEE, S. T., ORR, K. B., ISRAELS, L. G.:
A Receptor for Fc on Mouse B-Lymphocytes.
J.Immunol. 108, 1319 (1972)

69. RADSZKIEWICZ, T., KOTZ, D., DENK, H.:
Spontaneous Rosette Formation by Lymphocytes.
Clin.Exp.Immunol. 26, 501 (1976)

70. REEVES, J. H., RENSHAW, H. W.:
Surface Membrane Markers on Bovine Peripheral Blood Lymphocytes.
Am.J.Vet.Res. 39, 917 (1978)

71. REISS, E., MERTENS, E., EHRICH, W. E.:
Agglutination of Bacteria by Lymphoid Cells in vitro.
Proc.Soc.Exp.Biol. 74, 732 (1950)

72. RICHTER, E., SUNDICK, R., WICK, G.:
Heteroagglutinins and Spontaneous Rosette-Forming Cells in Obese Strain (OS) Chickens.
Z.Immun.-Forschung 149, 61 (1975)

73. SACHS, L.:
Statistische Methoden.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1976)

74. SATO, K.:
Thymus Dependency of Antigen-Binding Cells in the Bone Marrow and Spleen of Chicks.
Immunology 32, 171 (1977)

75. SATO, K., ITOH, M.:
Rosette Formation in Chicks:
With Special Reference to QRBC.
aus BENEDICT, A. A.
Advances in Experimental Medicine and Biology
Vol. 88 (1977)

76. SCHEIDEGGER, J. J.:
Une Micro-Méthode de l'immune-éléctrophorèse.
Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 7, 103 (1955)

77. SCHEU, M.:
Zur weiteren Charakterisierung einer Dysgammaglobulinämie beim Huhn und einer möglichen T-Zellregulation durch B-Zellen am Vorgang der Allergie vom verzögerten Typ.
Dissertation, Uni München (1978)

78. SCHIRRMACHER, V., HALLORAN, P., DAVID, C. S.:
Interactions of Fc-Receptors with Antibodies Against Ia Antigens and other Cell Surface Components.
J.Exp.Med. 141, 1201 (1975)

79. TUFVESON, G., BÄCK, R., ALM, G. V.:
Studies of the Spontaneous Rosette-Forming Cells in the Bursa of Fabricius of the Chicken.
Int.Arch.Allergy 46, 393 (1974)

80. WEBB, S. R., COOPER, M. D.:
T Cells Can Bind via Cytophilic IgM Antibody Made by B Cells.
J.Immunology 111, 275 (1973)

81. WOODY, J. N.:
Charakteristics of the 'Active Rosette Test':
I. Technical Considerations of the Test and Comments.
J.Immunological Methods 8, 331 (1975)

82. WYBRAN, J., CARR, M. C., FUDENBERG, H. H.:
The Human Rosette-Forming Cell as a Marker of a Population of Thymus-Derived Cells.
J.Clinical Investigation 51, 2537 (1972)

83. YOSHIDA, T. O., ANDERSON, B.:
Evidence for a Receptor Recognizing Antigen Complexed Immunoglobulin on the Surface of Activated Lymphocytes.
Scand.J.Immunol. 1, 401 (1972)

84. ZAALBERG, O. B.:
A simple Method for Detecting Single Antibody-Forming Cells.
Nature 202, 1231 (1964)

85. ZAALBERG, O. B., VAN DER MEUL, V. A., VAN TWISK, J. M.:
Antibody Production by Single Spleen Cells: A Comparative Study of the Cluster on Agar-plaque Formation.
Nature 210, 544 (1966)

Herrn Prof. Dr. U. Lösch möchte ich hiermit meinen besonderen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas und für seine hilfsbereite Unterstützung und jederzeit gewährte Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Zugleich danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merkenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Frau Dr. H. Fiedler sei für die Einarbeitung und Frau E. Zappe für die vorbildliche Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der Versuche gedankt.

Schließlich sei noch die persönliche und freundschaftliche Atmosphäre und Unterstützung des Labor Lösch erwähnt.

Lebenslauf

Am 21. Oktober 1951 wurde ich, Carlo E. Piacenza, als Sohn des Lungenfacharztes Dr. med. Ferdinand Piacenza und seiner Ehefrau Yella, geb. Lauter, in Friedrichshafen am Bodensee geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Tiefenbach, jetzt Gemeinde Oberstdorf im Allgäu, besuchte ich das Liechtensteinische Gymnasium (neusprachlicher Zweig) in Vaduz/Fl als Internatsschüler des Collegium Marianum. Die Maturaprüfung legte ich dort am 18. März 1971 ab. Am 31. März 1971 legte ich die Anerkennungsprüfung für deutsche Staatsbürger mit ausländischem Bildungsnachweis ab.

Im Wintersemester 1971/1972 begann ich das Studium der Veterinärmedizin im München an der Ludwig-Maximilians-Universität. Meinen Wehrdienst leistete ich von April 1973 bis Mai 1974 in Kempten im Allgäu ab. Im Mai 1974 nahm ich das Studium der Tiermedizin wieder auf. Das Staatsexamen legte ich am 21. Oktober 1977 ab.

Zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation arbeitete ich von Dezember 1977 bis Mai 1979 am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der Universität München.